

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE
OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA**

***DINÁMICA DE LA HORMONA ANTI-
MÜLLERIANA DURANTE LOS
TRATAMIENTOS DE FIV-ICSI Y SU
CORRELACIÓN CON LAS TASAS DE
GESTACIÓN***

Tesis doctoral

Laura Melado Vidales

Diciembre 2014

***DINÁMICA DE LA HORMONA ANTI-
MÜLLERIANA DURANTE LOS
TRATAMIENTOS DE FIV-ICSI Y SU
CORRELACIÓN CON LAS TASAS DE
GESTACIÓN***

Directores:

Dr. José Manuel Bajo Arenas

Dr. Isidoro Bruna Catalán

Autor:

Laura Melado Vidales

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

*A mis hijas, Martina y Sofía,
por las horas robadas.*

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. José Manuel Bajo Arenas**, Director de esta tesis, por su apoyo y trabajo en la dirección de esta tesis.

Al **Dr. Isidoro Bruna**, Codirector de esta tesis, por su tiempo y su dedicación en este trabajo, pero también por su apoyo continuo y tantos ánimos que me ha transmitido.

A **todo el equipo de Ginefiv**. A los gerentes, por creer en mí desde el principio. A mis compañeras ginecólogas, por dedicar su tiempo a ayudarme en el reclutamiento. Al equipo de SAP, por tantas analíticas. Al equipo de laboratorio de FIV y Andrología, por el procesamiento de las muestras. A las auxiliares y demás compañeras, por hacer el día a día más fácil.

Al **Dr. Vicente Martínez**, por prestarme, en este largo camino que ha supuesto la realización de esta tesis, su gran inteligencia y capacidad investigadora, por ser mi amigo y mi confidente, por tantas palabras de aliento en momentos cruciales.

Al **Dr. Alonso Fernández**, por tantas horas de estadística, por tanta paciencia siempre con una sonrisa en los labios. Porque es una suerte teneros a Vicente y a ti como amigos.

A **mis padres**, por enseñarme el camino del esfuerzo y la superación personal y profesional, por ser mis guías, por tantos sacrificios, por su amor incondicional.

A mi **tía Angelina**, por ser mi ángel protector, por enseñarme a luchar para ser feliz.

A la **Dra. Carmen Cuadrado Mangas**, mi maestra y mentora, mi ejemplo en lo profesional y en lo personal. Por tantas enseñanzas, por tantos momentos buenos, porque quiero parecerme a ti.

Y el mayor de los agradecimientos es para **mis hijas y mi marido. Juan Carlos**, por ser mi compañero en este camino tan especial que hemos emprendido juntos, por toda la fuerza que desprende, por quererme como soy. **Martina y Sofía**, por ser mi razón de vivir. Porque sois los primeros que estáis en mis pensamientos al despertar, por ser mi alegría cada día.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	9
1.- INTRODUCCIÓN.....	12
1.1.- CONTEXTUALIZACIÓN: FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA.....	12
1.1.1.- Edad, fertilidad y esterilidad.....	14
1.1.2.- Diagnóstico de esterilidad: pruebas a realizar.....	14
1.1.3.- Tratamientos de reproducción.....	18
1.2.- RECUERDO ANATOMO-FISIOLÓGICO.....	24
1.3.- HISTORIA.....	25
1.4.- LA MOLÉCULA DE AMH.....	27
1.4.1 La molécula de AMH bovina.....	27
1.4.2 La molécula de AMH humana.....	28
1.4.3 Precursores de la AMH.....	30
1.4.4 Procesamiento de la AMH.....	30
1.5.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	31
1.5.1 Mecanismo de acción.....	31
1.5.2 Regresión de los conductos de Müller.....	34
1.5.3 El papel de la AMH en el ovario.....	35
1.5.3.1 La AMH y los folículos primordiales.....	35
1.5.3.2 Acción de la AMH y de la FSH.....	38
1.6.- LOS TESTS DIAGNÓSTICOS DE AMH.....	39
2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA.....	40

2.1. AMH en la evaluación de la reserva ovárica.....	41
2.2. Correlación de AMH con RFA.....	44
2.3. AMH y fallo ovárico precoz.....	46
2.4. Efecto de los ACO en el patrón de secreción de AMH.....	48
2.5. AMH en mujeres con amenorrea.....	48
2.6. AMH y embarazo.....	49
2.7. AMH y síndrome de ovarios poliquísticos.....	49
2.8. AMH y endometriosis.....	51
2.9. AMH y otras lesiones orgánicas del ovario.....	52
2.10. AMH y cáncer de ovario.....	55
2.11. AMH y su utilidad en procedimientos de fertilización asistida.....	59
2.12. Comportamiento de la AMH durante el ciclo menstrual.....	59
2.13. Comportamiento de la AMH durante los ciclos de estimulación ovárica controlada.....	59
2.14. AMH como marcador de calidad ovocitaria.....	60
2.15 AMH en el líquido folicular.....	61
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO/OBJETIVOS.....	64
3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	64
3.2. OBJETIVOS.....	66
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	68
4.1. Diseño y criterios de selección.....	68
4.2. Protocolo de estimulación ovárica.....	69

4.3. Recogida de muestras en sangre y líquido folicular.....	71
4.4. Análisis hormonal en suero y líquido folicular.....	71
4.5. Análisis estadístico.....	72
4.6. Consideraciones éticas.....	72
5. RESULTADOS.....	73
6. DISCUSIÓN.....	92
7. CONCLUSIONES.....	103
8. BIBLIOGRAFÍA.....	105
9. ANEXOS.....	126

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

AMH: anti-Müllerian hormone (Hormona anti-Mülleriana).

rAMHH: hormona anti-Mülleriana recombinante humana.

AMHR-I: receptor de la hormona anti-Mülleriana tipo I.

AMHR-II: receptor de la hormona anti-Mülleriana tipo II.

BMP: bone morphogenetic proteins.

DHFR: dihidrofolatoreductasa.

E2: estradiol.

ELISA: enzyme – linked inmunoabsorbent assay.

E: especificidad.

ETV: ecografía trans-vaginal.

FIV: fecundación “in Vitro”.

FSH: follicle stimulating hormone (Hormona estimuladora del folículo).

FSHb: FSH basal.

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas.

GnSAF: Factor atenuante del pico de gonadotropinas.

HOC: hiperestimulación ovárica controlada.

ICSI: intracytoplasmatic sperm injection.

IMC: índice de masa corporal.

IR: índice de resistencia insulínica.

kD: kiloDalton.

L: litro.

LF: líquido folicular.

LH: luteinizing hormone.

LR: likelihood ratio.

mg: miligramo.

MIF: mullerian inhibiting factor.

MIS: mullerian inhibiting substance.

ml: mililitro.

ng: nanogramos.

OR: odds ratio.

pg: picogramos.

PCOS: síndrome de ovario poliquístico.

RFA: recuento de folículos antrales.

RO: reserva ovárica.

ROC: receiver operating characteristic.

S: sensibilidad.

SHO: síndrome de hiperestimulación ovárica.

TGF β : Transforming Growing Factor β .

TRO: test de reserva ovárica.

TRA: tratamientos de reproducción asistida.

UI: unidades internacionales.

VPN: valor predictivo negativo.

VPP: valor predictivo positivo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- CONTEXTUALIZACIÓN. FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

La importancia de los temas de reproducción en nuestra sociedad se hacen cada vez más evidentes. No sólo bajo el punto de vista individual o de pareja (deseo de ser madre o padre) sino desde la visión colectiva de sociedad (intereses sociales de un correcto balance demográfico). Todo esto hace que el concepto de fertilidad y sus problemas de esterilidad e infertilidad, esté muy arraigado en todos nosotros.

En España se estima que casi un 15% de las parejas en edad reproductiva tienen problemas de esterilidad y existen cerca de un millón de parejas demandantes de asistencia reproductiva. En los últimos años parece que los datos epidemiológicos reflejan un incremento de los problemas de fertilidad en las parejas, posiblemente derivado de múltiples factores: fisiológicos, ambientales y sociodemográficos. Este hecho está teniendo respuesta por parte del desarrollo de las técnicas de reproducción asistida que pueden solucionar una demanda creciente.

Los términos esterilidad y fertilidad no significan lo mismo en medicina de la reproducción y en demografía. Así para la demografía la población fértil es aquella que ha tenido hijos, mientras que el término fertilidad en el sentido reproductivo en demografía se denomina como fecundidad (o capacidad de tener hijos). De este modo, la mayoría de los trabajos de índole demográfica –que suelen ser los más apropiados para calcular la prevalencia de la mayoría de las enfermedades– cuando hablan de frecuencia de esterilidad se refieren al porcentaje de mujeres en edad fértil sin hijos, término solo indirectamente relacionado con lo que entendemos por esterilidad en reproducción humana. En cambio, desde el punto de vista de la medicina de la reproducción por fertilidad nos referimos a la capacidad de una pareja para tener hijos. El concepto infertilidad corresponde a lo opuesto de fertilidad, es decir, a la incapacidad de una pareja para tener hijos. Si bien en la terminología española hasta hace unos años se diferenciaba entre esterilidad (o dificultad para conseguir el embarazo) e infertilidad (dificultad para conseguir que los embarazos concluyeran en recién nacidos), en la actualidad el Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española los considera como sinónimos. La definición más comúnmente aceptada de

esterilidad/infertilidad es la de la ausencia de consecución de embarazo tras 12 meses de relaciones sexuales sin empleo de métodos anticonceptivos. Esta es la definición que emplea la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), la Asociación Americana de Medicina de la Reproducción (ASRM) y la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) considera que el periodo sin consecución de embarazo para poder hablar de esterilidad debe ser de 24 meses.

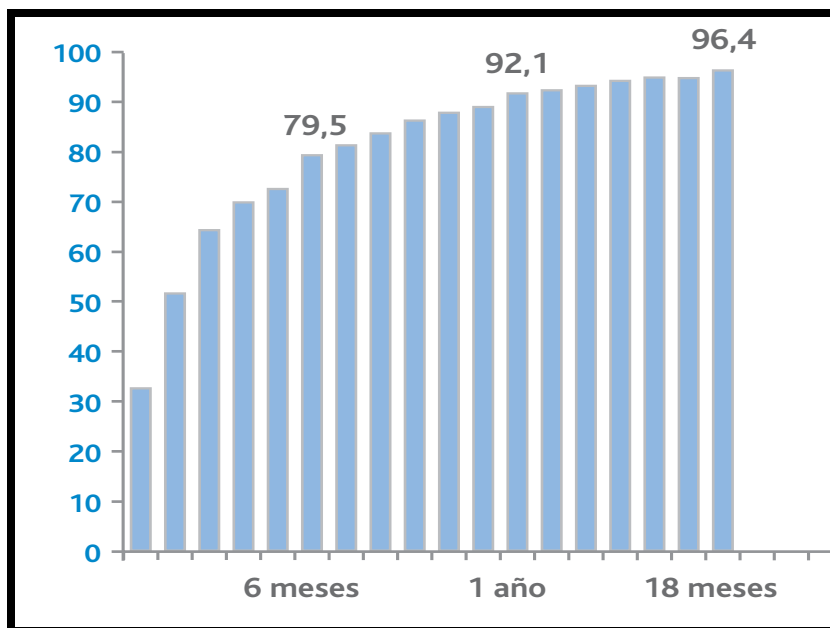


Figura 1. Tasa (%) de embarazo por ciclo de exposición coital sin anticoncepción (Libro blanco de fertilidad, 2011). La mayoría de parejas logran embarazo en los primeros 12 meses. Es por ello que se recomienda realizar un estudio a la pareja si pasado un año no se ha logrado el objetivo.

Habitualmente distinguimos entre esterilidad absoluta y subfertilidad. La esterilidad absoluta correspondería a las parejas en las que hay un impedimento total para la consecución del embarazo. Tal es el caso por ejemplo de las azoospermias y de las obstrucciones tubáricas completas. Frente a ello se encuentra la subfertilidad o esterilidad relativa. Se trata de parejas en las que está presente un impedimento parcial en su fecundidad, en las que existe algún problema que determina que su fecundidad sea más baja de lo normal, pero no nula. Esta es la situación más común

entre las parejas que consultan en la actualidad por problemas reproductivos.

1.1.1.- EDAD, FERTILIDAD Y ESTERILIDAD.

Es bien conocido que conforme se incrementa la edad de la mujer, disminuye su fertilidad. Ello se ha visto en diversos estudios analizando el número de hijos según la edad de la mujer, en poblaciones que no empleaban métodos anticonceptivos, bien porque aún no habían sido descubiertos, o bien por ser absolutamente rechazados en ese grupo poblacional. Es clásico el trabajo de Hendershot y Pratt, repetido con similares resultados por diferentes autores, en que se evidencia cómo la tasa de embarazo disminuye progresivamente conforme se incrementa la edad. Así, entre mujeres casadas no estériles tras 12 meses de exposición coital no protegida, la tasa de embarazo fue del 86% de los 20 a 24 años; del 78% de los 25 a 29; del 63% de los 30 a 34 y del 52% de los 35 a los 40 (Hendershot 1982). Menken et al. en Estados Unidos reseñaron algo similar en 1986: la frecuencia de esterilidad pasaba del 10% entre los 20-29 años, al 25% entre los 30-39, y al 50% por encima de 40 años (Menken 1986). La influencia de la edad del varón en la esterilidad es más controvertida.

Existe la impresión de que cada vez existe un mayor número de parejas estériles, habiéndose hablado de una "epidemia de esterilidad". Se estima que en Estados Unidos en el año 2025 habrá unos 6,5 millones de mujeres que padezcan esterilidad (Stephen 1998). Probablemente en los demás países occidentales ocurra algo semejante. Presumiblemente más que ante un aumento de la patología causante de esterilidad nos encontremos en un contexto clínico diferente al de las décadas precedentes. El factor que guarda una relación más importante con el incremento de las consultas por esterilidad es el retraso en la edad en que se comienza a buscar el primer hijo. Y, como hemos mencionado previamente, pequeños incrementos en la edad media de las mujeres pueden tener unos llamativos incrementos en la frecuencia de esterilidad.

1.1.2.- DIAGNÓSTICO DE ESTERILIDAD: PRUEBAS A REALIZAR.

La prevalencia de infertilidad se sitúa alrededor del 14%, lo que supone que

aproximadamente 1 de cada 7 parejas en edad reproductiva va a presentar dificultades para tener descendencia. Sin embargo, existen factores que afectan de forma evidente a esta capacidad reproductiva, aconsejando iniciar el estudio antes de que transcurra un año, o bien iniciar directamente el tratamiento. Entre ellos el más importante es la edad de la mujer (>35 años), pero también hay que tener en cuenta: Amenorrea u oligomenorrea mayor de 6 meses, enfermedad pélvica inflamatoria, cirugía abdominal pélvica, patología tubárica, uterina u ovárica, enfermedades genéticas, patología o cirugía genital previa en el varón y enfermedades de transmisión sexual. Merece la pena recordar, que se deben estudiar de manera simultánea a ambos miembros de la pareja ya que las causas de esterilidad se reparten de la siguiente manera: 30% causa femenina, 30% causa masculina; 25% causa mixta y un 15% esterilidad de origen desconocido. Además, no es infrecuente que durante el estudio de esterilidad se descubran otras patologías relacionadas o no con la esterilidad.

Las pruebas diagnósticas empleadas para el estudio de la pareja estéril se han ido simplificando con los años debido a que muchos métodos diagnósticos son imperfectos, demoran el inicio del tratamiento y encarecen el proceso. También hay que considerar el avance en las técnicas de reproducción asistida, de manera que los propios tratamientos van a proporcionar una información más veraz sobre las verdaderas causas de esterilidad (Balasch 2000).

Las bases del diagnóstico de esterilidad se sustentan en: Anamnesis y exploración física, confirmar la existencia de ovulación, confirmar la integridad anatómica del canal genital y confirmar la presencia de una proporción suficiente de espermatozoides morfológica y funcionalmente normales.

El estudio de la mujer se debe iniciar siempre con una completa anamnesis y exploración física y ginecológica, haciendo hincapié en los siguientes aspectos:

- Historia clínica: edad, antecedentes reproductivos, ciclo menstrual, tiempo de infertilidad, antecedentes médicos y quirúrgicos, medicamentos, alergias, ocupación laboral, tabaco, alcohol, drogas y antecedentes familiares.
- Exploración física: índice de masa corporal, signos de hiperandrogenismo, exploración mamaria, exploración abdominal y pélvica.

Para poder establecer que el ovario “funciona” es suficiente con preguntar sobre el ciclo menstrual. Una mujer que tiene menstruaciones cada 26-36 días ovulará de

manera regular, salvo excepciones.

Es sabido que a medida que aumenta la edad de la mujer, disminuye la cantidad de folículos con capacidad de desarrollo y maduración, pero también disminuye la calidad de los óvulos. Este patrón, no siempre se asocia a la edad avanzada, puesto que hay pacientes jóvenes que se comportan como mujeres añosas y viceversa. Para poder establecer el potencial reproductivo de cada mujer es fundamental establecer la reserva ovárica.

La determinación de los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH), estradiol y hormona luteinizante (LH) en los tres primeros días del ciclo, ha sido una prueba determinante para poder establecer la reserva ovárica y poder predecir la respuesta a los tratamientos de reproducción y en menor medida, la probabilidad de conseguir gestación. El problema de la determinación de la FSH es la gran variabilidad dentro del mismo ciclo y en los ciclos consecutivos (Broekmans 2006).

Se han buscado otros marcadores indirectos de reserva ovárica y en la actualidad son de importancia el recuento de folículos antrales por ecografía y la determinación de la hormona anti-mulleriana (AMH). El recuento de folículos antrales es una técnica sencilla, reproducible, independiente del ciclo menstrual y que se realiza de manera sistemática para predecir la respuesta ovárica a los tratamientos de reproducción. Los niveles de AMH parece que constituyen un reflejo más fiel de la cantidad de folículos restantes en el ovario, lo que constituye la reserva ovárica. Los estudios actuales orientan a que la AMH constituye el principal marcador de la reserva ovárica (La Marca 2010).

Para la valoración cervical podemos introducir la cánula de transferencia embrionaria. Nos permite valorar el paso transcervical a la cavidad uterina. La presencia de dificultades o la imposibilidad de introducir la cánula hasta cavidad endometrial nos va a orientar a completar el estudio con cérvico-histeroscopia diagnóstica.

Para valorar la morfología uterina hemos de realizar una ecografía transvaginal y, en ocasiones, histerosonografía: la normalidad anatómica del útero puede ser fácilmente comprobada en una ecografía transvaginal. Ante la presencia ecográfica de alguna anomalía a nivel de la cavidad endometrial, esta prueba se verá completada mediante la realización de una histerosonografía, que gracias a la distensión de la cavidad endometrial con suero fisiológico, nos va a permitir verificar con una alta fiabilidad

cualquier anomalía subyacente.

Ante la sospecha de patología en la cavidad endometrial, la prueba diagnóstica indicada es la histeroscopia, que permite un estudio directo de la cavidad. La laparoscopia nos permite la visión directa del contorno uterino. Ambas son pruebas diagnósticas complementarias en el diagnóstico definitivo de dos entidades importantes: las masas uterinas y las malformaciones uterinas.

La permeabilidad tubárica puede comprobarse mediante el empleo de sustancias líquidas que añadidas a los métodos de exploración visual demuestren su paso de la cavidad uterina hacia el exterior de la cavidad abdominal. Normalmente se ha utilizado la histerosalpingografía (HSG) y la laparoscopia. La validez de la HSG para el diagnóstico de la obstrucción tubárica está demostrada, ya que nos ofrece un 93% de sensibilidad y un 90% de especificidad (Chen 1988) con respecto a los hallazgos laparoscópicos. Por tanto, una vez hecho el diagnóstico de obstrucción por HSG, estaría indicada la realización de una FIV sin necesidad de laparoscopia previa. Sin embargo, para otro tipo de anomalías, la HSG detecta solo el 20-30% de los hallazgos laparoscópicos. Este hecho hace que nos planteemos o no la necesidad de realizar una laparoscopia, para completar el diagnóstico cuando la HSG nos informa de un resultado normal. El empleo de sustancias líquidas con los ecógrafos transvaginales (histerosonosalpingografía) ha permitido obtener bastante información sobre la vía tubárica; sin embargo, todavía no ha logrado sustituir a los otros métodos de análisis de la permeabilidad tubárica. La detección en suero de antígenos frente a la *Chlamydia*, agente responsable de gran parte de la patología tubárica, constituye una opción para algunas pacientes en las que no han podido realizarse la HSG.

Para valorar la funcionalidad tubárica, recientemente se ha introducido en el arsenal diagnóstico la hidrolaparoscopia (ya que lo que se instila en la cavidad abdominal es suero fisiológico) o fertiloscopia. Es una cirugía mínimamente invasiva que permite visualizar las trompas, sobretodo en su porción más distal, y que permite el diagnóstico y tratamiento de algunas lesiones o adherencias pélvicas. Su abordaje es a través del espacio de Douglas y se acompaña de la realización de una histeroscopia diagnóstica (Campo 2002).

El estudio de la muestra espermática basa sus criterios de morfología, movilidad, así como las características físicas y químicas en los criterios de la OMS (World health organization (WHO) 2010). En la actualidad se consideran normales aquellas muestras

que presentan una concentración mayor de 15 millones por ml, una movilidad A+B superior o igual al 35% y una morfología igual o superior al 4%. Si se detecta alguna anomalía en los parámetros mencionados, es mandatoria la realización de un segundo seminograma con la realización de un recuento de espermatozoides móviles. En función de los parámetros obtenidos, se orientará el tratamiento de reproducción que mejor posibilidades ofrezca para poder conseguir gestación.

Las pruebas diagnósticas que consideramos esenciales se dirigen por tanto a:

1. Demostrar que la mujer ovula, para lo cual es suficiente comprobar que menstrúa cada 28 ± 7 días. En mujeres que sobrepasan los 35 años determinamos sistemáticamente, de forma basal, la FSH y el estradiol, y el número de folículos antrales para evaluar su reserva de óvulos. Si los niveles de FSH son superiores a 10, se solicitan otras pruebas para evaluar la reserva ovárica (AMH).
2. Demostrar que el semen es normal, para lo cual se realiza un seminograma.
3. Demostrar que el aparato genital es normal, para lo cual basta inicialmente con una ecografía transvaginal que explore útero y ovarios y que completaremos con una histerosonografía en caso de encontrar cualquier anomalía endometrial y con una histeroscopia en caso de considerarlo necesario.
4. En aquellos casos en los que la historia reproductiva de la mujer y el estudio del semen lo aconsejen se realizará histerosalpingografía.

A partir de ese momento, se decide ya un tratamiento para la pareja, o se realizan exploraciones complementarias si el estudio inicial lo requiere.

1.1.3.- TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN.

En función de las pruebas diagnósticas, existen tres grandes grupos de tratamientos:

1. Inseminación artificial.

Es la técnica mediante la cual se deposita el semen capacitado dentro del útero. Para poder realizar esta técnica la paciente precisa de tener las trompas permeables, canal genital normal, y el varón tener un seminograma con un recuento de espermatozoides

móviles progresivos postcapacitación >3 millones (Van Waart 2001). Previamente a la realización de la inseminación, la mujer es estimulada generalmente con gonadotropinas para obtener 1 ó 2 folículos de adecuado tamaño. La inseminación se realiza mediante una cánula intrauterina que deposita el semen previamente capacitado, en el fondo uterino.

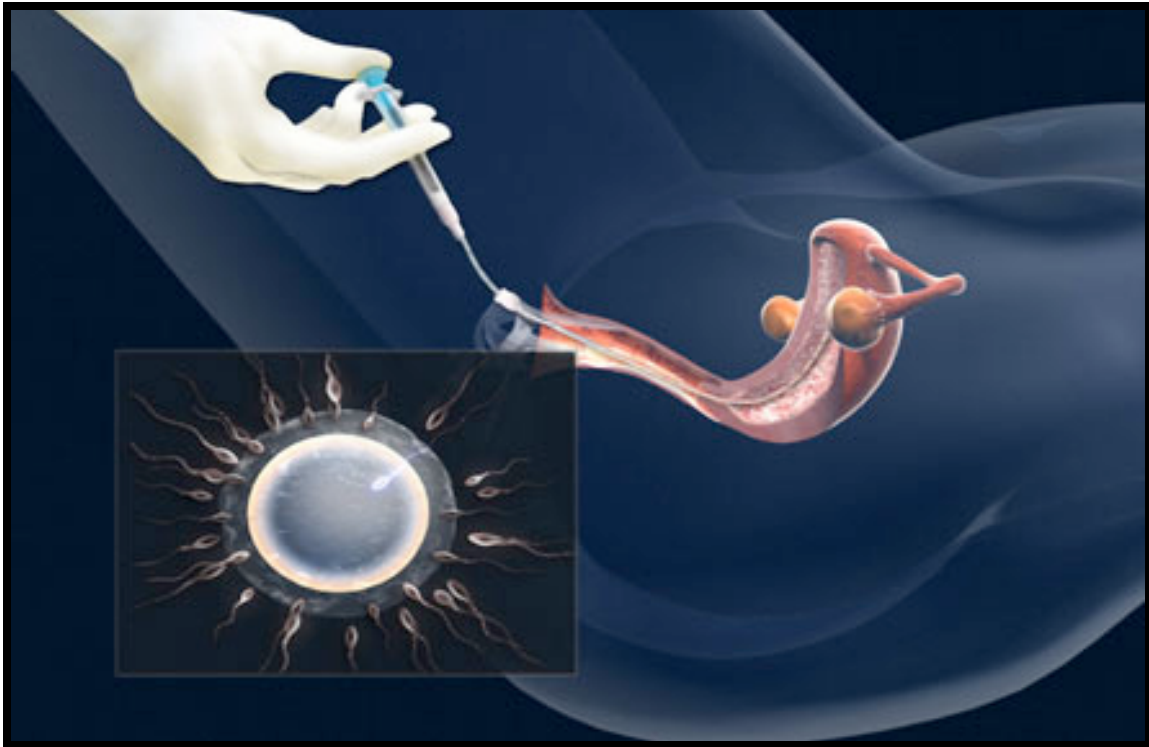


Imagen 1. Simulación de una inseminación intrauterina. La cánula deposita la muestra espermática capacitada dentro del útero (Herrero y cols, 2009).

El número de inseminaciones a realizar en cada ciclo suele ser de 1 ó 2, dependiendo del centro. El número total de ciclos que se suelen realizar es de un total de 4 en el caso de IA con semen de su pareja y hasta 6, en el caso de que el semen sea de un banco de donantes (Sánchez 2007).

2. Fecundación in vitro.

Es la técnica de reproducción asistida mediante la cual la unión de ambos gametos tiene lugar en el laboratorio. Los embriones resultantes son transferidos finalmente al útero para conseguir gestación. Para la realización de la fecundación in vitro, existen unos pasos fundamentales, pero que no en todas las circunstancias siguen el mismo orden.

- Obtención de ovocitos: el éxito de las técnicas de reproducción se incrementó cuando se introdujeron los fármacos que permitieron estimular el ovario de manera controlada para aumentar la respuesta ovárica. La estimulación ovárica puede realizarse mediante la combinación de varios tipos distintos de fármacos: Con análogos de GnRH (hormona liberadora de gonadotropina): antagonistas o agonistas; con diferentes tipos de gonadotropinas: FSH recombinante o urinaria, HMG, LH; y con inductores de la ovulación como letrozol o citrato de clomifeno. En circunstancias especiales, como pacientes con baja respuesta o con edad avanzada cuya respuesta a la estimulación ovárica es escasa, se pueden obtener ovocitos en un ciclo natural sin medicación, o bien con un ciclo natural con escasa medicación (ciclo natural modificado).
- Origen de los ovocitos: la dificultad técnica para poder congelar los ovocitos, de igual manera que ocurría con el semen, condicionó durante un periodo de tiempo los tratamientos de reproducción. Así pues, en aquellos casos de alta respuesta o de baja respuesta, el tratamiento era cancelado o bien se seguía adelante, asumiendo riesgos por parte de la paciente. Con la incorporación de la vitrificación de ovocitos (técnica de laboratorio que permite congelar los ovocitos para ser almacenados) se ha optimizado la estimulación ovárica. Así pues, actualmente los casos en los que se vitrifican ovocitos son en las altas respuestas para evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica tardía, en las bajas respuestas para poder conseguir el número de ovocitos adecuado en función de la edad para poder asegurar la posibilidad de gestación, en las pacientes que deseen posponer el tratamiento de reproducción (en pacientes oncológicas para preservar la fertilidad; en mujeres sin pareja, etc), y en aquellos casos de alteraciones hormonales durante la estimulación que puedan afectar a los resultados del tratamiento (luteinización prematura, etc.).

Por lo tanto, cuando se va a realizar una FIV/ICSI, los ovocitos pueden proceder de un ciclo estimulado en fresco o bien haber sido vitrificados en estimulaciones previas. Una vez tenemos todos los ovocitos (tanto los provenientes de un ciclo en fresco, como aquellos vitrificados) la manera de proceder con ellos es idéntica, y vendrá condicionada por los parámetros seminales, número de ovocitos o antecedentes previos.



Imagen 2. Simulación de punción folicular para recuperación de ovocitos, guiada por ultrasonido vaginal bajo sedación (Herrero y cols, 2009).

Una vez producida la inseminación de los ovocitos, tenemos los embriones resultantes que serán finalmente transferidos en diferentes estadios de desarrollo: embriones en estadio de células (día 2 o día 3 de desarrollo) o embriones en estadio de blastocisto.

En algunas circunstancias, los embriones son sometidos a una manipulación en su día 3 de desarrollo para biopsiar una célula embrionaria y poder ser analizada mediante FISH y/o PCR. Mediante esta técnica se permite el diagnóstico genético preimplantatorio de los embriones antes de ser transferidos.

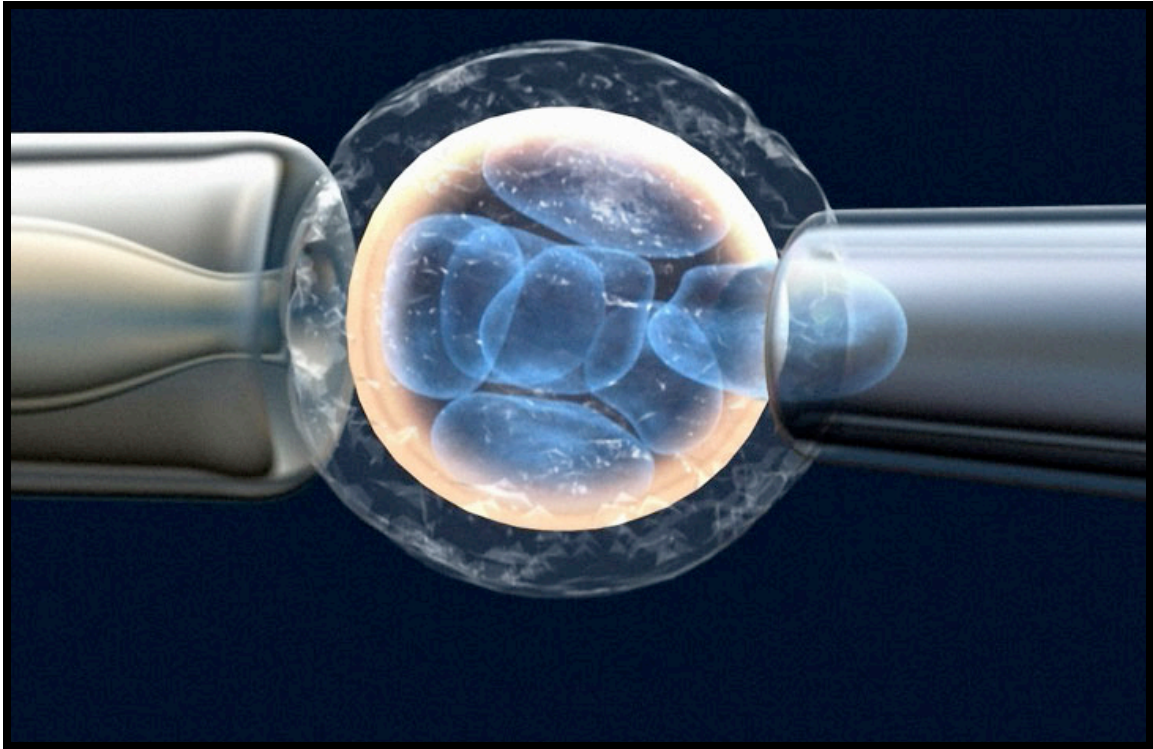


Imagen 3. Simulación de biopsia embrionaria para diagnóstico genético preimplantacional. El embrión en estadio de células (día 3 de desarrollo) es biopsiado para extracción de una blastómera (Herrero y cols, 2009).

3. Donación de ovocitos.

Es la técnica de reproducción asistida en la cual los ovocitos proceden de una mujer distinta a la que va a resultar gestante. Esta técnica actualmente está ampliamente aceptada porque han aumentado las indicaciones de la misma y en segundo lugar, por los resultados obtenidos, ya que constituye la técnica de reproducción asistida con mejores resultados (Budak 2007).

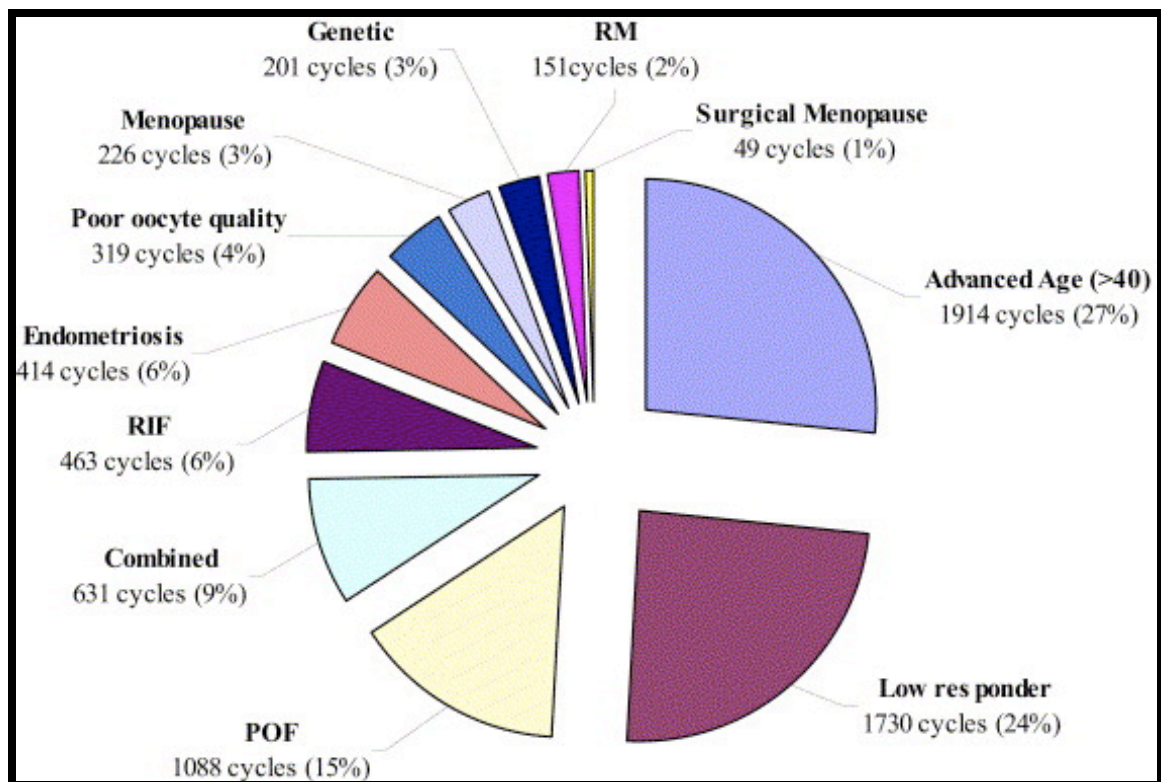


Figura 2. Indicaciones para la realización de donación de ovocitos. POF = premature ovarian failure, RIF = recurrent IVF failure, RM = recurrent miscarriage (Budak 2007).

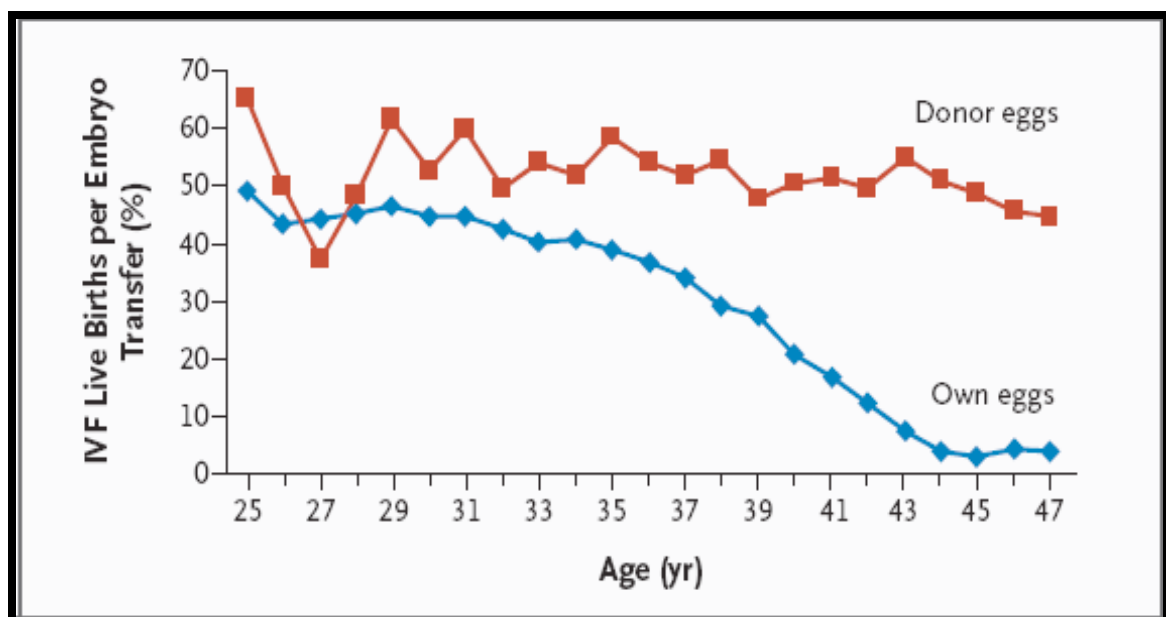


Figura 3. Porcentaje de embarazo mediante FIV por grupo de edades, comparado con donación de óvulos (Broekman, 2006).

Para la donación de ovocitos, existen tres pasos:

- Estimulación de la mujer que será la donante de óvulos.
- Cuando los óvulos son obtenidos tras la punción folicular, son inseminados por el semen de la pareja. Este paso se denomina “donación”.
- Preparación endometrial por parte de la receptora de los embriones para poder conseguir un endometrio adecuado con capacidad de implantación. Este endometrio adecuado se puede conseguir: en un ciclo natural sin medicación, o en un ciclo sustituido con estrógenos y análogos de la GnRH (tanto agonistas como antagonistas) para poder conseguir una quiescencia ovárica que permita mantener el endometrio receptivo durante un periodo largo de tiempo.

La incorporación de la vitrificación de ovocitos de mujeres donantes ha permitido la posibilidad de que las unidades de Reproducción asistida puedan crear también, de manera similar al banco de semen, un banco de ovocitos que ha supuesto una mejora en la sincronización entre donantes y receptoras, así como aumentar la calidad del programa de donación. El banco de ovocitos permite desde el punto de vista de logística una mejor programación, además ha disminuído la espera de la donación de manera significativa, disminuyendo la tasa de cancelación de receptoras (Cobo 2008).

Como hemos visto, para cualquiera de estos tratamientos, es fundamental conocer lo más ajustadamente posible la reserva ovárica y para ello, la AMH va a resultar su principal test diagnóstico de evaluación.

1.2. RECUERDO ANATOMO-FISIOLÓGICO DE LA AMH.

La hormona anti-Mülleriana, es una glicoproteína dimérica de 140 kDa, miembro de la superfamilia de los *Transforming Growing Factor* β (TGF β), factores implicados en el crecimiento y diferenciación, que también incluye las inhibinas, activinas, proteínas morfogenéticas del hueso y factores de crecimiento y diferenciación (*Growth and Differentiation Factors*, GDFs). Los miembros de esta familia juegan un importante papel en las interacciones epitelio-mesenquimales, crecimiento celular, producción de matriz extracelular y remodelación tisular (Massagué 2000).

También se denomina, en Estados Unidos, “Müllerian Inhibiting Substance” (MIS) y “Müllerian Inhibiting Factor” (MIF).

En 1947, Jost demostró que la AMH expresada en las células de Sertoli de los testículos, durante la diferenciación sexual masculina, era la responsable de la regresión de los conductos de Müller, origen del tracto genital femenino (Jost 1947), y por tanto, del normal desarrollo del tracto reproductivo del varón. La secreción de la AMH por las células de Sertoli comienza durante la embriogénesis y continúa a lo largo de toda la vida.

Los conductos de Müller son los precursores del útero, las trompas de Falopio y los dos tercios superiores de la vagina en la mujer. En las mujeres, la AMH se expresa en el ovario mucho después de que los conductos Müllerianos pierdan su sensibilidad a la hormona (Munstenberg 1991, Visser 1998). En el ovario humano, la AMH se expresa después de la semana 36 de gestación (Rajjpert-De Meyts 1999), por las células de la granulosa del ovario, hasta la menopausia. Entonces, se hace indetectable.

1.3. HISTORIA

1.3.1. Inicio teórico.

El profesor Alfred Jost († 1991) fue un estudioso de los procesos que llevan a la diferenciación sexual. En 1947 sugirió la existencia de un factor testicular específico, responsable de la regresión de los derivados müllerianos en el feto masculino, al que llamó "*Hormone Inhibitrice*" (Jost 1947). Probó esta teoría en 1952, implantando un cristal de testosterona y un fragmento de tejido testicular cerca del ovario de fetos de conejo, comprobando que el tejido testicular inducía la regresión del conducto de Müller adyacente, en contra de lo que ocurría con la testosterona.

Con esto, Jost concluyó que debía existir una sustancia testicular diferente de la testosterona que era responsable de la regresión de los derivados müllerianos (Jost 1953).

1.3.2. Cuantificación de la actividad anti-Mülleriana.

En 1969, Régine Picon, investigadora en el laboratorio de Jost, abrió el camino de la purificación de esta molécula, "*Müllerian inhibitor*", desarrollando un ensayo biológico semicuantitativo (en uso en la actualidad), capaz de medir su actividad utilizando tractos genitales de fetos de rata en los días 14 a 15 postcoito (Picon 1969).

1.3.3. Purificación de la molécula.

Picard y cols. acuñaron el término “Anti-Müllerian *Hormone*” y presentaron en 1978 el esbozo inicial de la estructura de la molécula de AMH bovina, inicialmente como una macromolécula no dializable (Josso 1972, Josso 1975), que no atraviesa membranas vitelinas por ser de naturaleza dimérica y glicoproteica (Picard 1978). La purificación de la molécula se inició utilizando testes fetales y neonatales de la especie bovina, dado el mayor tamaño de éstos que los hace más fáciles de conseguir y manipular. En 1984, estos autores lograron purificar la molécula en un medio de incubación por medio de inmunocromatografía con anticuerpo monoclonal (Picard 1984).

1.3.4. Investigación genética.

Poco después, en 1986, se consiguió la clonación del ADNc bovino (Picard 1986). Se inició el estudio de su efecto anti-tumoral (Cate 1986) con lo que, en los años posteriores, se avanzó notablemente en el conocimiento de su mecanismo de acción (Donahoe 1987, Josso 1986, MacLaughlin 1991). Ese mismo año se publican los resultados de la clonación del gen humano de la hormona anti-Mülleriana gracias a las investigaciones de Cate et al. (Cate 1986), que lo secuenciaron y localizaron en el cromosoma 19, dentro de la sub-banda p13.2-p13.3.

1.3.5. Avances en las técnicas de análisis.

Los descubrimientos relativos a la molécula y la genética que regula la producción corren paralelos al desarrollo de métodos de medida cada vez más sensibles y específicos, no sólo de la actividad de la hormona, sino de su concentración en líquidos biológicos.

Inicialmente se consiguió detectar la producción de AMH en el testículo durante los periodos fetal y perinatal (Picon 1969, Picon 1970, Josso 1971, Donahoe 1977a y b) por medio de técnicas inmunocitoquímicas, pero la invasividad de la obtención de la muestra limitaba su indicación (Vigier 1983); además, los anticuerpos monoclonales que se utilizaban eran zooespecíficos, es decir, habían sido desarrollados contra la AMH bovina.

Este desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas más sensibles permitió extender este período hasta la pubertad (Vigier 1983, Tran 1987, Baker 1999, Hudson 1990, Josso 1990) e incluso, aunque en cantidades muy pequeñas, al ovario adulto (Vigier 1984,

Takahashi 1986, Bézard 1987, Ueno 1989). Hasta la llegada de métodos inmunohistoquímicos capaces de medir los niveles de AMH humana en suero circulante, las posibles aplicaciones clínicas de la investigación sobre la AMH se han visto retrasadas.

Finalmente, en 1990, se desarrolló un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), que permite cuantificar la AMH circulante en suero. La sensibilidad de esta prueba es adecuada, capaz de detectar concentraciones de 0.1-0.5 ng/ml (Baker 1999, Hudson 1990, Josso 1990).

1.4.- LA MOLÉCULA DE AMH.

Como se ha descrito anteriormente, la AMH es un miembro de una gran familia multigénica de glicoproteínas (Cate 1986), con diversas funciones relacionadas con el crecimiento y la diferenciación celular (Massagué 1990, Liu 1991). Entre las moléculas que la forman cabe distinguir: TGF- β (Derynck 1985), inhibinas (Mason 1985), activinas (Ling 1986, Vale 1986), BMP (Bone Morphogenetic Proteins) (Wozney 1988), el producto predicho del gen decapentaplégico de *Drosophila* (Padgett 1987, Gelbart 1985), la proteína Vg-1 de *Xenopus* (Weeks 1987), la proteína relacionada con Vgr-1 de mamíferos (Lyons 1989) y el factor de crecimiento GDF-1 (Lee 1990).

1.4.1. La molécula de AMH bovina

La purificación de la molécula de AMH bovina se consiguió inicialmente utilizando la cromatografía de intercambio iónico seguida por cromatografía de afinidad por tinción de lectina pero ofrecía una purificación incompleta. La fracción obtenida que presentaba actividad anti-Mülleriana se denominó Green-III (Budzik 1983, Budzik 1985).

La homogenización de la molécula llegó con la inmunocromatografía con anticuerpo monoclonal, precedida por una precipitación en sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico (Picard 1984). Las últimas técnicas de purificación mejoran considerablemente la biodisponibilidad de la molécula obtenida (Lorenzo 2002).

La AMH bovina contiene una alta proporción de residuos hidrofóbicos, como leucina y

prolina, mientras que los residuos ácidos y básicos están representados aproximadamente en igual cantidad. El núcleo aminoacídico se une a carbohidratos a través de enlaces tanto N como O-oligosacáridos, siendo el total de azúcares del 13.6% (Picard 1986).

La molécula de AMH bovina original está formada por subunidades que se unen con puentes disulfuro, en dímeros o tetrámeros. En condiciones reductoras, estas moléculas grandes se dividen en moléculas monoméricas de 72 kD (según Picard y Josso (Picard 1984) o en fragmentos ligeramente diferentes de 70 y 74 kD que comparten el mismo extremo N-terminal, lo cual sugiere que el péptido menor es un producto de la proteólisis del mayor según Cate y cols. (Cate 1986).

1.4.2. La molécula de AMH humana

La AMH se sintetiza como un gran precursor de 560 aminoácidos, con una secuencia de señal corta de 18 aminoácidos, seguida de la pre-prohormona que forma homodímeros. Antes de su secreción, la hormona madura es glicosilada y dimerizada para dar un dímero de 144 kDa compuesto por dos subunidades idénticas monoméricas de 72kDa, ligadas por puentes disulfuro. Cada monómero contiene 1 dominio N-terminal (también llamado región “pro”) y un dominio C-terminal (también llamado región “madura”).

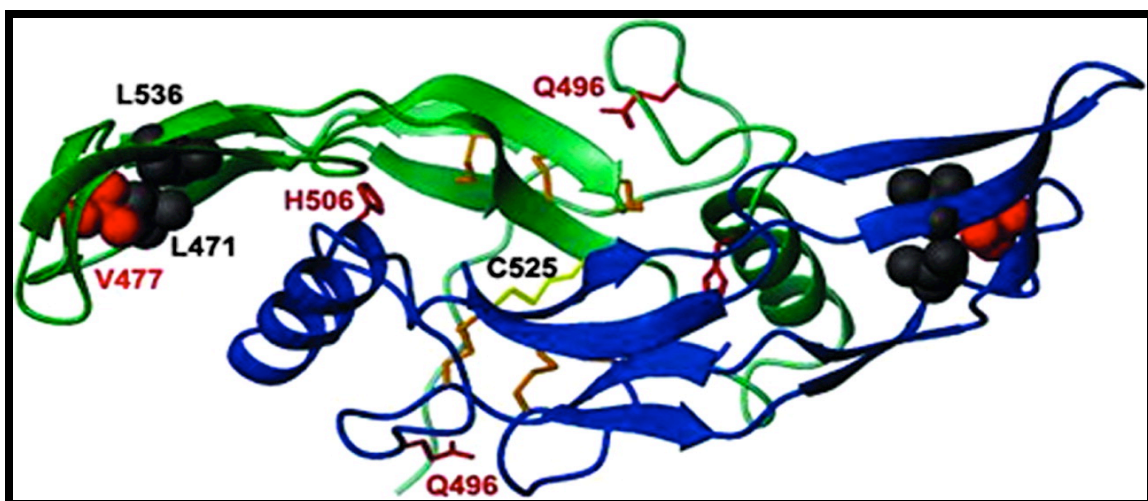


Figura 4: Modelo tridimensional de la hormona antimülleriana. Las posiciones de

aminoácidos señaladas corresponden a las mutaciones más frecuentes conocidas. (Josso, 2005).

A diferencia de otros miembros de la superfamilia de TGF- β , se considera que la AMH necesita el dominio N-terminal para potenciar la actividad del dominio C-terminal y alcanzar su completa bioactividad (Wilson 1993).

Entre el 5 y el 20% de AMH se fragmenta en un punto específico entre los dominios N-terminal y C-terminal del monómero de 72 durante el paso citoplasmático, para formar dos polipéptidos de 58 kDa (región pro) y 12 kDa (región madura)

La AMH recombinante humana (rAMHH) se obtuvo a partir de un medio de cultivo de células ováricas de hámster chino al que se introdujo por transfección el gen humano de AMH, bajo el control de un promotor viral, junto a DNA recombinante del gen de la dihidrofolatoreductasa (DHFR), todo ello dentro del plásmido pAdD26. El conjunto se transporta en el vector pSV2 (Pepinsky 1988, Wallen 1989) cuya eficiencia de transfección se facilita con otro gen, el facilitador SV40, el cual a su vez es también transportado por el vector pSV2. Este transporte conjunto permite la coamplificación de ambos genes, el de la DHFR y el de la AMH humana.

La AMH producida de esta forma se purificó desde el medio de cultivo mediante una combinación de intercambio iónico, lentil-lectina y cromatografía de inmunoafinidad con un anticuerpo monoclonal (Kaufman 1985).

El patrón electroforético con Western Blot de la rAMH obtenida (en un gel con gradiente 4-30% de poliacrilamida en presencia de sodio-dodecil-sulfato) muestra bandas de migración en las que se pueden diferenciar fragmentos de varios tamaños: en condiciones no reductoras (sin mercaptoetanol), la AMH migra como un dímero de 144 kD, aunque también se ven agregados de mayor peso molecular. En condiciones reductoras la hormona se disocia en subunidades de 72 kD, por ruptura de puentes disulfuro. Existe una banda inferior de 57 kD que representa el fragmento proteolítico N-terminal. El extremo C-terminal es muy pequeño y migra fuera del gel (Pepinsky 1988).

1.4.3. Precursores de AMH.

1.4.3.1. Precursor de AMH humana.

La AMH humana se sintetiza como un gran precursor de 560 aminoácidos, en forma de dímero de dos unidades idénticas unidas por puentes disulfuro, que pesa 144 kD (Donahoe 1982). Para alcanzar la formación de la proteína madura, se eliminan 8 residuos adicionales (Cate 1986).

1.4.3.2. Comparación entre especies.

La clonación de los genes de ratón (Münsterberg 1991) y rata (Haqq 1992) permite comparar la secuencia proteica de los precursores de la AMH en cuatro especies. El precursor bovino es el mayor, con 575 aminoácidos, seguido por el humano con 560, ratón con 555 y rata 553 residuos. Todos poseen una secuencia corta inicial, un péptido señal (Pepinsky 1988).

La homología de AMH humana con la AMH bovina es del 78%, más marcada en el extremo C-terminal (96.3%) (Kanehisa 1984). Es en esta zona C-terminal donde reside la homología entre los miembros de la superfamilia TGF- β , con un rango de entre el 20 y el 40% de los aminoácidos. Esta región contiene los siete residuos de cisterna que forman los puentes disulfuro, además de otros grupos de aminoácidos muy preservados entre las moléculas de esta familia (Gelbart 1989). Paradójicamente, la mayoría de las diferencias están en el extremo C-terminal, que es mucho menos homólogo, en torno al 68% entre humana y bovina, aunque lo es más entre rata y ratón, con un 89% de homología.

1.4.4. Procesamiento de la AMH.

El 5-20% de la rAMHH se rompe por dos sitios monobásicos (Pepinsky 1988, Ragin 1992): el primero 109 aminoácidos más allá del extremo C-terminal, entre Arg427 y Ser428, (el cual está localizado en el 5º exón del gen de AMH en humanos, bovinos y ratas) y el segundo entre Arg229 y Ser230. Se conoce la proteasa que interviene en el *splicing* de la molécula, la llamada Pc5, así como el gen que la codifica (Naehtigal 1996). El procesamiento es conducido a término por la plasmida, la cual induce una ruptura mayoritaria de la molécula entre Arg427 y Ser428, dando lugar a dos

fragmentos diméricos, uno mayor N-terminal de 110 kD (inactivo por sí solo, que puede dividirse por el sitio secundario de ruptura si se expone a plasmita en fragmentos de 34 y 22 kD (Ragin 1992) y otro menor C- terminal de 25 kD, los cuales quedan asociados en un complejo no covalente.

Este complejo puede romperse por tratamiento ácido o por ebullición; estos dos métodos inactivan la molécula, por lo que no pueden usarse en el estudio del sitio bioactivo de los fragmentos de proteólisis. Este problema se ha solucionado empleando deoxicolato como agente disociador (di Clemente 1992) y también separando los fragmentos C y N terminales en una columna de gel de filtración equilibrada en ácido acético 1M con 0.3 mg/ml de polietilenglicol 3350 a 4°C. Estas muestras generadas en ácido se liofilizan y resuspenden en HCl 1mM antes de su uso para prevenir así la agregación que destruiría la bioactividad. De esta forma se puede llegar al mapeado del sitio activo de la molécula. Tras inducir la disociación, sólo el fragmento C-terminal muestra actividad biológica (Wilson 1993). Esto sugiere que este extremo conservado es el portador de la actividad.

Los mecanismos de procesamiento desde el precursor hasta la proteína madura ocurren en otros miembros de la familia TGF- β : el precursor de TGF- β se segrega como una molécula grande e inactiva, en la cual un monodímero de 25 kDa C-terminal está asociado de forma no covalente a otro dímero, llamado péptido asociado, a la latencia de TGF- β (Wakefield 1988). El dímero C-terminal debe separarse para desarrollar la actividad de la molécula en forma de homodímeros de 110 a 130 aminoácidos unidos con puentes disulfuro para ser biológicamente activos (Gelbart 1989). De esta forma, los complejos asociados a latencia regulan la bioactividad de los extremos C- terminales (Gray 1990). No está claro que este tipo de procesamiento sea necesario en el caso de AMH in vivo, ya que no posee un sitio de ruptura dibásico, y la molécula de AMH sin fraccionar es biológicamente activa en cultivo de órganos. No obstante, si se altera la secuencia y se cambia Arg por Tre en el sitio de ruptura, la AMH mutante resultante, indivisible, no es capaz de inducir regresión de los conductos de Müller en un cultivo orgánico (Cate 1990).

1.5.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

1.5.1. Mecanismo de acción.

Los miembros de la familia TGF- β tienen sus efectos a través de dos tipos de receptores serin-treonin-kinasa, denominados tipo I y tipo II, y de dos efectores citoplasmáticos, Smads regulados por receptores (R-Smad) y Smad comunes (Smad4). El receptor primario, tipo II, se une al ligando y fosforila al receptor tipo I. Una vez activado, este último fosforila el R-Smad, que interactúa con el Smad4. Este complejo es posteriormente transportado al núcleo donde se une a un elemento de unión al Smad (SBE), en el promotor de la diana o en los genes (Massagué 2000).

Hasta la fecha, se han clonado cinco receptores tipo II, seis receptores tipo I y cinco proteínas R-Smad. Los TGF- β y las activinas, a través de T β R-II y ActR-II o ActR-IIB, respectivamente, activan los receptores Alk1 y Alk2 de tipo I y los R-Smad1, R-Smad5 o R-Smad8.

Los diferentes componentes del patrón de señalización de la AMH se han descubierto por homología con otros miembros de la familia de TGF- β .

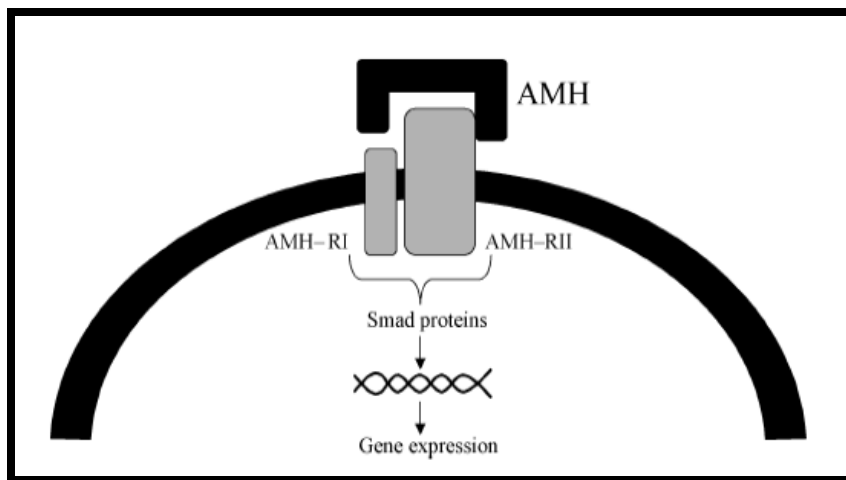


Figura 5. Receptor de la AMH. Después de la unión del ligando a la unidad AMH tipo II, la tipo I es incluida en el complejo y es fosforilada en su extremo intracitoplasmático. El sector fosforilado se transloca al núcleo donde regula la expresión génica.

1.5.1.1 Receptores de AMH tipo II.

El ADNc del receptor de AMH primario o tipo II (AMHR-II), fue clonado en 1994 en la rata (Baarends 1994) y en el conejo (di Clemente 1994), utilizando genes procedentes

del testículo y el ovario, respectivamente. Un año más tarde se aisló el gen humano (Imbrand 1995). Se localiza en el cromosoma 12 y está constituido 11 exones repartidos en más de 8 kbp. Los tres primeros exones codifican para el dominio extracelular, el cuarto para el dominio transmembrana, y los últimos siete exones para el dominio kinasa intracelular.

El mensajero del AMHR-II se expresa de forma específica por los órganos diana de la AMH, como los conductos de Müller y las gónadas de ambos sexos. Los estudios de hibridación in situ han demostrado que, en los conductos de Müller, el ARNm del AMHR-II se expresa en las células mesenquimales que rodean el epitelio (Baarends 1994, di Clemente 1994), siguiendo un gradiente craneo- caudal (Allard 2000), y desaparece en el varón tras la regresión de los conductos de Müller. En el ovario, el AMHR-II se expresa desde la vida fetal hasta la etapa adulta en las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales (Baarends 1995a).

En el testículo, se expresa desde el periodo fetal hasta la pubertad. Su expresión continúa hasta la etapa adulta en roedores, con un máximo en el estadio VII del ciclo de espermatogénesis, en el momento del pico de AMH (Baarends 1995b), pero se reprime tras la pubertad en conejos (di Clemente 1994). Inicialmente descubierta en las células de Sertoli, su presencia fue detectada posteriormente en células de Leydig adultas (Racine 1998).

Como sucede en todos los receptores tipo II de la familia TGF- β , el mensajero del AMHR-II se traduce en una proteína de 82kDa (Faure 1996), que se corresponde con el peso molecular extraído de su secuencia de nucleótidos y de la presencia de 2 cadenas N-glucosidasa. Esta forma del receptor es la madura, con la que se expresa en la superficie de la célula, a la que se une la AMH y la que es insensible a la endoglucosidasa H.

El receptor de AMH tipo II es altamente específico, desde que su disrupción en ratones origina un fenotipo similar al de los ratones con déficit de AMH, como por la persistencia de los derivados mullerianos y la hiperplasia de las células de Leydig en machos (Behringer 1994, Mishina 1996).

1.5.1.2 Receptores de AMH tipo I.

Dado que se han producido numerosos intentos de clonar un receptor tipo I de AMH sin éxito, se ha probado si la AMH podría usar uno de los receptores tipo I de la familia de los TGF- β para llevar a cabo sus efectos. Se estudiaron varios criterios: la capacidad del receptor tipo I de interactuar con AMHR-II de una forma ligando-dependiente, su coexpresión con AMHR-II en células diana de AMH, la capacidad de una versión dominante negativa o un oligómero anti-sense de bloquear un efecto de la AMH, y los defectos inducidos por su disrupción o mutación “in vivo”.

Alk6

El primer receptor de AMH tipo I identificado (Gouédard 2000), Alk6, fue aislado de los seis receptores tipo I de la familia TGF- β por su capacidad de interactuar de una manera dependiente de ligando con AMHR-II en células CHO que expresan de forma permanente AMHR-II humana (CHO-3W) (Imbeaud 1995).

Alk2

Aunque Alk2 no interactúa con AMHR-II en células CHO-3W, se coexpresa con AMHR-II en todas las células diana de la AMH, en particular en células mesenquimales que rodean los conductos de Müller durante el periodo crítico de la regresión Mülleriana (Visser 2001).

Alk3

Alk3 interactúa fuertemente con AMHR-II en las células CHO-3W; su perfil de expresión en los órganos diana de la AMH no ha sido estudiado y de acuerdo con algunos informes (Visser 2001), su versión negativa dominante no bloquea la estimulación de la AMH de T1x2 en células P19. Sin embargo, fue demostrado en 2002 que la disrupción selectiva de Alk3 en los órganos diana conduce a una persistencia de los conductos de Müller en ratones, un fenotipo comparable al producido por la disrupción de los genes de AMH o AMHR-II, sugiriendo que Alk3 media la regresión de la AMH de los conductos de Müller (Jamin 2002).

1.5.2. Regresión de los conductos de Müller.

En el embrión de los mamíferos, ambos sexos son inicialmente indistinguibles. El sistema reproductor del embrión masculino y femenino consiste en una gónada

indiferenciada y dos conductos, los de Wolff y los de Müller, precursores de los tractos reproductores masculinos (epidídimo, conductos deferentes y vesículas seminales) y femeninos (trompas de Falopio, útero y parte superior de la vagina), respectivamente. Por tanto, el embrión es inicialmente indiferenciado, y el correcto desarrollo sexual depende de la producción y respuesta a las hormonas testiculares. En el embrión masculino, la AMH, producida por las células de Sertoli, de los testículos embrionarios en diferenciación, provoca la pérdida del conducto de Müller, y la testosterona producida por las células de Leydig estimula el desarrollo de los conductos de Wolf (Behringer 1994).

Los conductos de Müller forman una invaginación del epitelio celómico lateral a los conductos mesonéfricos, y la molécula de señal Wnt-4 es crucial para su desarrollo (Vainio 1999). En la región de los conductos sexuales en desarrollo, la expresión de Wnt-4 está ausente del epitelio y mesénquima del conducto de Wolff, pero se expresa fuertemente en el mesénquima que limita el conducto de Müller recientemente formado.

La señal Wnt-4 derivada del mesénquima es esencial para los estadios iniciales de la morfogénesis ductal (Vainio 1999). El conducto de Müller formado, produce entonces niveles elevados de otro miembro de la familia Wnt, el Wnt-7, que hace al mesénquima competente para responder a la señal de la AMH a través de su receptor (Parr 1998). La AMH actúa sobre el epitelio ductal según un mecanismo paracrino, dado que las células mesenquimales que rodean el conducto de Müller expresan el receptor tipo II (AMHR-II) (Baarends 1994, de Clemente 1994).

Por tanto, la formación del conducto de Müller y su regresión en el embrión humano requieren de una interacción mesénquima-epitelio sucesiva y temporal.

1.5.3. El papel de la AMH en el ovario.

1.5.3.1. La AMH y los folículos primordiales.

Durante la diferenciación sexual femenina la AMH no se expresa en el ovario. La AMH se expresa por primera vez en las células de la granulosa de los folículos primordiales

reclutados, encontrados por primera vez en ovarios de ratas el día 3° o 4° de vida postnatal (Burlinger 2002), y en el feto humano a partir de la 36 semana de gestación (Rajpert-De Meyts 1999). La AMH continúa expresándose en los folículos en crecimiento del ovario hasta que han alcanzado el tamaño y estadio de diferenciación, en el que serán seleccionados para llegar a ser dominantes mediante la acción de la hormona estimulante de los folículos (FSH) hipofisaria. En la rata esto ocurre en el estadio antral inicial en folículos pequeños en crecimiento (Durlinger 2002), y en humanos en folículos antrales de 4-6 mm de tamaño (Weenen 2004). Por tanto, la AMH se expresa en los folículos reclutados del pool de folículos primordiales que no han sido seleccionados para la dominancia. Antes y después de estos dos importantes puntos de regulación en el ovario, la AMH no se expresa.

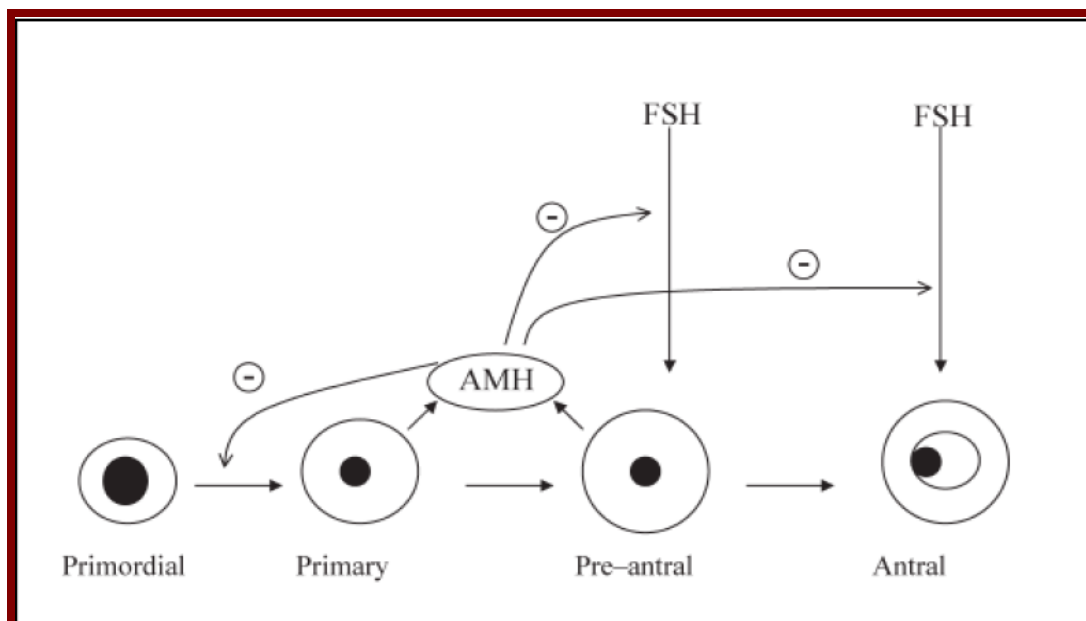


Figura 6: Rol de la AMH en la foliculogénesis. La expresión de la AMH puede observarse inicialmente en células de la granulosa de folículos primarios, y con una intensa expresión en folículos pre-antrales, antrales pequeños ($\leq 4\text{mm}$). La expresión de la AMH va desapareciendo a medida que crece el folículo, hasta desaparecer en folículos mayores a 8-10mm. Solamente queda un remanente en las células del cúmulo oóforo. Esto sugiere un importante rol en el inicio del reclutamiento folicular para la AMH, así como en la selección del folículo dominante. La AMH parece regular negativamente el desarrollo temprano folicular. La AMH previene el reclutamiento de folículos no dominantes.

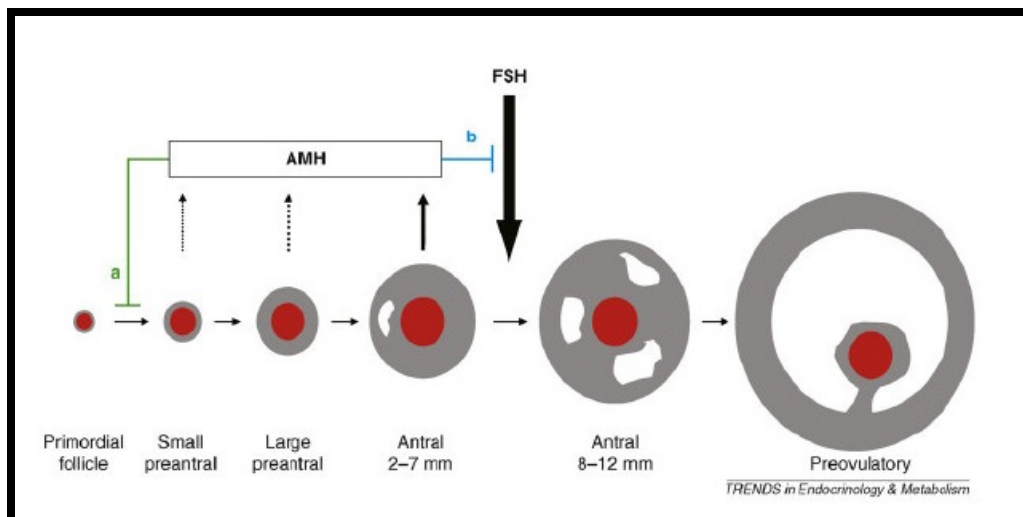


Figura 7: El papel de la AMH en los dos compartimentos principales de desarrollo folicular del ovario normal (Broekmans, 2008)

Este patrón de expresión indicó que la AMH debía tener un papel importante en la regulación del número de folículos en crecimiento y en su selección para la ovulación. Estas funciones potenciales de la AMH se investigaron utilizando modelos de ratas sin AMH (AMH-null) (Durlinger 1999).

Los ovarios de las ratas AMH-null y del tipo salvaje de la misma camada son seleccionados y todos sus folículos contados y separados en clases diferentes, basándose en su tamaño y estado de atresia. Los ovarios de los ratones AMH-null son más grandes que aquellos de los animales salvajes, y el aumento de peso está ocasionado por un número tres veces superior de pequeños folículos no atrésicos en crecimiento. Se sugería que este mayor conteo era debido a un aumento del reclutamiento desde el pool primordial, porque su tamaño se encontraba disminuido de forma significativa en animales AMH-null comparado con el tipo salvaje.

La mayor tasa de reclutamiento de folículos primordiales llevaría a un agotamiento prematuro del pool folicular causando una anovulación más temprana en animales de edad, lo que ha sido comprobado comparando los dos grupos de animales (Durlinger 2000), objetivándose un cese de ovulaciones más temprano en el grupo AMH-null.

Un hallazgo interesante fue la detección de un fenotipo intermedio en las ratas heterocigotas para el alelo AMH-null. Esta acción del gen de AMH dosis dependiente podría indicar que la producción o secreción ovárica no se encuentra bajo un control retroactivo estricto, sino que depende de la actividad intrínseca del propio gen.

Para investigar si los efectos de la AMH se producen directamente en los folículos primordiales, ovarios neonatales de ratas AMH-null de dos días de edad fueron cultivados “in vitro” en presencia de AMH. Tras dos días de exposición a AMH, se hallaron aproximadamente el 50% menos de folículos en crecimiento, mostrando que la AMH podría afectar de forma directa a los folículos primordiales (Durlinger 2002). El receptor de AMH tipo II, que es el único receptor tipo II de la hormona, se expresa en el ovario inmediatamente tras el nacimiento, cuando los folículos primordiales aún no se han formado y se continúa expresando a lo largo de toda la vida (Durlinger 2002). Por tanto, el efecto de la AMH es, sobre todo, en las células pre-granulosas que rodean al ovocito en el folículo primordial.

1.5.3.2. Acción de la AMH y de la FSH.

Las determinaciones hormonales en hembras AMH-null revelaron que la FSH en estos animales era baja, comparada con los animales de tipo salvaje, y que a pesar de estos niveles bajos de FSH, el número de folículos en crecimiento estaba aumentado, lo que sugería que en ausencia de AMH, los folículos podrían ser más sensibles a FSH (Durlinger 2000). Esta hipótesis se confirmó con el cultivo de folículos preantrales de rata “in Vitro”. La AMH inhibía el crecimiento folicular FSH-dependiente de una forma tiempo dependiente, de modo que los folículos cultivados en presencia de AMH tenían un diámetro menor (Durlinger 2001). Este efecto de la AMH era, fundamentalmente, el resultado de una disminución en la proliferación de las células de la granulosa y era consistente con los resultados obtenidos en otros estudios “in vitro”.

El efecto de la AMH en los folículos sensibles a FSH fue testado posteriormente en un modelo “in vivo” en el que la dinámica folicular se comparó en animales tipo salvaje y AMH-null en presencia de concentraciones séricas altas (con inyecciones adicionales de FSH) y bajas (tras tratamiento con antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas) de FSH. Este estudio mostró que, a pesar de los bajos niveles de FSH, se encontraron más folículos en crecimiento en los animales AMH-null que en los salvajes. También en presencia de niveles elevados de FSH, la estimulación del crecimiento folicular fue más llamativa en ratas AMH-null que en las de tipo salvaje, tanto en términos de número como de estadio de desarrollo (Durlinger 2001). En

consecuencia, tanto los estudios “in vivo” como “in vitro” muestran que los folículos son más sensibles a FSH en ausencia de AMH.

Los efectos inhibitorios de la AMH en la sensibilidad a FSH de los folículos podrían jugar un papel importante en el proceso de selección. Durante la selección, un grupo de folículos se distingue del grupo de folículos en crecimiento productores de AMH, para continuar su desarrollo hasta el estadio preovulatorio. Se cree que, dependiendo de su estadio de desarrollo, cada folículo requiere una concentración de FSH determinada para continuar su crecimiento, de modo que cada uno establece su punto de corte de FSH. Esta concentración debe superarse para asegurar la selección.

Dado que la AMH afecta la sensibilidad de los folículos a la FSH, podría jugar un papel importante en la determinación de qué folículos deben ser seleccionados y cuáles deben ser excluidos a través de la atresia. Dicho papel se sostiene por el diferente patrón de expresión de la AMH en folículos no atrésicos grandes preantrales y pequeños antrales en el ovario de la rata (Baarends 1995a). Aunque indistinguibles morfológicamente, algunos folículos muestran una menor expresión de AMH que otros, y estos folículos podrían ser más sensibles a la FSH, y más propensos a ser seleccionados en el pico de FSH secundario.

1.6.- LOS TEST DIAGNÓSTICOS DE AMH.

La hormona anti-mülleriana es la molécula del momento en medicina reproductiva, con un incremento de su reconocimiento de que puede revolucionar la endocrinología reproductiva. Actualmente, el principal campo de aplicación es en los ciclos de FIV, donde permite predecir tanto la baja respuesta como la hiperrespuesta (La Marca 2006), la individualización de estrategias terapéuticas (Nelson 2009) y el consejo a las parejas sobre la posibilidad de conseguir un niño en casa tras un tratamiento de reproducción asistida (La Marca 2005).

Pero de hecho, su potencial es mucho mayor. Hay evidencias de que es útil como criterio diagnóstico de la amenorrea secundaria, permitiendo distinguir entre WHO clase II y III de amenorrea, puede medir el daño ovárico tras cirugía o quimioterapia, y puede ser un buen marcador en el seguimiento de los tumores de células de la granulosa. Por último y debido a una relación única con el número de folículos primordiales, tiene la capacidad de predecir la aparición de la menopausia.

El gran potencial de la AMH se debe fundamentalmente a que tiene unas características muy importantes y únicas en el campo de la endocrinología ginecológica. Primero, la AMH circulante parece provenir exclusivamente del ovario, ya que una ooforectomía bilateral en mujeres premenopáusicas y menopáusicas esta asociada con concentraciones indetectables de AMH (La Marca 2005). Segundo, en el ovario está producida por un solo tipo de células, las células de la granulosa (Weenen 2004), lo que permite su uso como marcador de la función de estas células. Es más, su síntesis y secreción es producida solo por las células de la granulosa de los folículos primarios y antrales pequeños (<4-6mm), facultando que la AMH sea el único marcador hormonal disponible hasta la fecha de la foliculogénesis independiente de gonadotropinas (Visser 2005). Otras características biológicas, como ser independiente de la FSH circulante (Fanchin 2003 a y b), ser relativamente estable a lo largo del ciclo menstrual y entre ciclos (La Marca 2006 a y b, Van Disseldorp 2009), más la posibilidad de medirla con un test de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), ha contribuido al incremento del uso de la AMH en la clínica habitual y en las publicaciones.

En los últimos 20 años se ha producido una evolución constante desde unas versiones de medición iniciales (Al-Qahtani 2005) hasta los más recientes sistemas comercializados: Diagnostic Systems Lab (DSL) e Immunotech (IOT) (también conocido como Immunotech Beckman Coulter (IBC) análisis. Como consecuencia, la mitad de los estudios publicados han empleado el análisis DSL y la otra mitad el IOT. Pero estos análisis utilizan tanto dos anticuerpos primarios diferentes contra AMH como diferentes estándares, y como consecuencia, los valores crudos publicados por autores y entre publicaciones puede variar sustancialmente, registrando IOT unos valores superiores de AMH que aquellos obtenidos por DSL.

Con la reciente consolidación de estas dos compañías a través de Beckman Coulter, hoy en día contamos finalmente con un único análisis de medición: AMH Gen II assay. Este nuevo análisis ha reemplazado a DSL e IOT, lo que combinado con que la compañía Beckman Coulter dispone de la patente internacional para la medición de AMH en muestras de mamíferos, siendo los únicos proveedores del análisis, el Gen II assay será dominante en los próximos años.

Por ello, los clínicos deben adaptarse a esta nueva generación de análisis de AMH. El nuevo Gen II assay ha sido calibrado de forma similar al antiguo IOT. Por tanto, son

los clínicos acostumbrados a emplear el análisis DSL los que deberán familiarizarse con los valores del nuevo Gen II assay, que son aproximadamente entre un 10-40% superiores a los valores que ellos utilizaban (Nelson 2009).

2.- ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA.

Como hemos desarrollado en el apartado previo, la AMH ha suscitado un interés exponencial en los últimos años. El número de publicaciones al respecto es amplísima, lo que en parte se ha facilitado gracias a métodos de medición que se han hecho cada vez más reproductibles y sencillos.

La AMH actúa como un mediador paracrino de la regulación del desarrollo folicular precoz a nivel de los ovarios (Durlinger et al., 1999). Es secretada por los folículos primarios, secundarios y antrales hasta 4-6 mm de diámetro y en los siguientes estadios de la foliculogénesis su secreción disminuye. Los folículos atrésicos secretan pequeñas cantidades de AMH, y el cuerpo lúteo no secreta AMH (Weenen et al., 2004). Debido a este papel que tiene la AMH en el desarrollo folicular primario, los niveles séricos de la hormona aportan una información muy valiosa en pacientes con función ovárica anormal, como la anovulación o el agotamiento folicular prematuro. La información acerca del desarrollo folicular inicial es de gran interés en las mujeres con el Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS). En ausencia de ciclos menstruales (amenorrea), la quiescencia ovárica puede deberse al insuficiente estímulo gonadotrópico o al agotamiento folicular del ovario. Debido a que el cambio en los niveles séricos de AMH precede al de otros marcadores endocrinos, como la inhibina B o el estradiol en la transición menopáusica (La Marca 2006b), se ha convertido en un marcador fiable del estado funcional ovárico. En este aspecto, la AMH, podría entonces ser utilizada como parámetro inicial de cribado en predicción de respuesta de las mujeres con PCOS a la inducción de ovulación, la inducción de ganancia ponderal en pacientes con anorexia nerviosa, o para el manejo del daño ovárico producido por el uso de agentes gonadotóxicos en pacientes con cáncer o enfermedades autoinmunes.

2.1 AMH en la evaluación de la reserva ovárica

El término reserva ovárica se emplea para designar la potencialidad reproductiva. Ha sido ampliamente establecida la relación entre el declinar de la capacidad biológica

reproductiva de la mujer y el efecto del paso del tiempo en relación a la pérdida de potencialidad de los gametos. Este hecho ha situado a la edad de la mujer en el punto de mira como factor pronóstico por excelencia de la capacidad reproductiva. Sin embargo, aunque es indudable la utilidad del parámetro “edad de la mujer” como primera aproximación, en el momento de definir la expectativa reproductiva de cada paciente en particular, se deben tener en cuenta aquellas herramientas que nos describan la reserva ovárica con mayor fiabilidad o sean capaces de modular la variabilidad biológica individual del efecto edad, ya que, no siempre existe una correlación entre edad cronológica y biológica gonadal. Por ello es fundamental disponer de marcadores o tests de reserva ovárica independientes de la edad cronológica, con el fin de predecir la capacidad individual de conseguir una gestación espontánea a raíz de la práctica de TRAs (Callejo et al., 2007).

El desarrollo de gametos competentes para la fertilización es el resultado de una correcta foliculogénesis. Ésta, es un proceso sumamente complejo, tanto por el número de mecanismos implicados, como por la ausencia de su conocimiento completo. De la literatura emerge una descripción clara del envejecimiento folicular mediado por el deterioro de las funciones específicas del ovocito y las células de la granulosa, como proceso no ajeno a la involución o disfunción de las células del organismo como un todo. De esta manera, las células del ovario se encuentran sujetas a cambios en la actividad mitocondrial, fallos energéticos, cambios en la expresión protéica, alteraciones génicas y cambios en el microambiente, simultáneamente con lo ocurrido para otras células y órganos. También se especula con la posibilidad de que el nivel de declinación celular lleve a los folículos y los ovocitos ovulados a ser más susceptibles a la activación de los programas celulares de apoptosis (Ling 1986).

A la compleja dinámica de la foliculogénesis y las carencias en el conocimiento de este proceso, se le suma el carácter multifactorial de estos fenómenos. Los cambios en la secreción de gonadotrofinas no son suficientes para comprender las permutas del envejecimiento ovárico, fundamentalmente debido a su ocurrencia tardía, surgiendo la necesidad de valerse de otros marcadores. Algunos autores apuntan en su investigación a los mecanismos basados en el estrés oxidativo, que afectaría tanto a los folículos arrestados como a los maduros. La exposición prolongada al estrés oxidativo y a los productos glicosilados, que se acumulan irreversiblemente a lo largo de la vida, afectan gradualmente al sistema vascular y promueven un aumento de la producción de sustancias oxígeno-reativas en el microambiente ovárico, las más

fuertemente asociadas al daño celular. Durante el desarrollo folicular, estas sustancias afectarían al ovocito y las células de la granulosa interfiriendo en la síntesis de los ARN y proteínas, así como en la eficacia de los mecanismos antioxidantes de defensa (Tatone 2008).

La búsqueda de factores relacionados con la capacidad ovárica fuera del eje hormonal gonado-hipofisario condujo a los ensayos de numerosas sustancias con la finalidad de predecir más precozmente la expectativa reproductiva. Así surgieron entre otras la inhibina y, más recientemente, la AMH. Esta hormona es considerada un marcador sensible de la reserva ovárica y, probablemente, de la fase precoz de envejecimiento ovárico, dado que refleja el tamaño del pool de folículos primordiales en crecimiento (Grujters 2003, Kevenaar 2006).

Estudios transgénicos indicaron que en ratones AMH-knock-out el recuento folicular al nacimiento era normal. Sin embargo, la depleción en el pool fue marcadamente acelerada en ausencia de la hormona, comprometiendo la capacidad reproductiva (Durlinger 1999). Esta observación sugiere que la AMH tiene un efecto inhibitorio directo o indirecto en la deplección del pool folicular.

La disminución de la fertilidad ocurrirá en forma muy temprana en aquellas pacientes predeterminadas a desarrollar una menopausia precoz. Aunque la edad promedio de la menopausia en los países desarrollados es de unos 51 años, aproximadamente 1 de cada 10 mujeres llegarán a la menopausia antes de los 45 años y aproximadamente 1 de cada 100 mujeres antes de los 40 años. Se ha postulado que la fertilidad disminuye 13 años antes de la menopausia, lo que viene a sugerir que 1 de cada 10 mujeres presentarán una fecundidad disminuida a la edad de 32 años (Nikolaou y Templeton, 2003). Es pues clara la importancia de identificar y cualificar este período, especialmente en este sub-grupo de pacientes, con el fin de poder aconsejarlas respecto a su potencial reproductivo.

Kelsey et al. en 2011 (Kelsey 2011), publican, partiendo de una muestra de 3.260 mujeres de todas las edades, el primer modelo de las concentraciones de AMH desde la concepción hasta la menopausia. Este modelo muestra que el 34% de la variación es debida exclusivamente a la edad y que la AMH alcanza un pico máximo a la edad de 24.5 años, siguiendo un descenso progresivo hasta la menopausia, lo que refleja la pérdida paulatina del pool folicular. Además, observó que existe un pico neonatal y otro prepuberal. Este modelo muestra así los puntos de inflexión de la

dinámica folicular ovárica, la alta variabilidad de AMH debida a la gran variación en la reserva ovárica interindividual y, consecuentemente, con la dispersión en la edad de la menopausia de las mujeres.

Generalmente el fallo ovárico prematuro es irreversible, sin embargo, se han descrito casos de embarazos esporádicos en estas pacientes. En algunos casos se ha evidenciado la persistencia de pequeños folículos, imperceptibles ecográficamente. La dosis de AMH permitiría identificar a este grupo de pacientes. Méduri G y cols. (Méduri 2007) encontraron una estrecha relación entre la presencia o no de folículos y su densidad en las biopsias ováricas, con los niveles de AMH, en 48 pacientes con diagnóstico de fallo ovárico. Los hallazgos histológicos en pacientes con fallo ovárico precoz podrían compararse con los de las ratas knock-out para AMH que citamos previamente, con una reserva inicial normal que se agota rápidamente, consecuencia de un reclutamiento acelerado, secundario a la ausencia del efecto inhibitor de la AMH en el desarrollo y reclutamiento folicular.

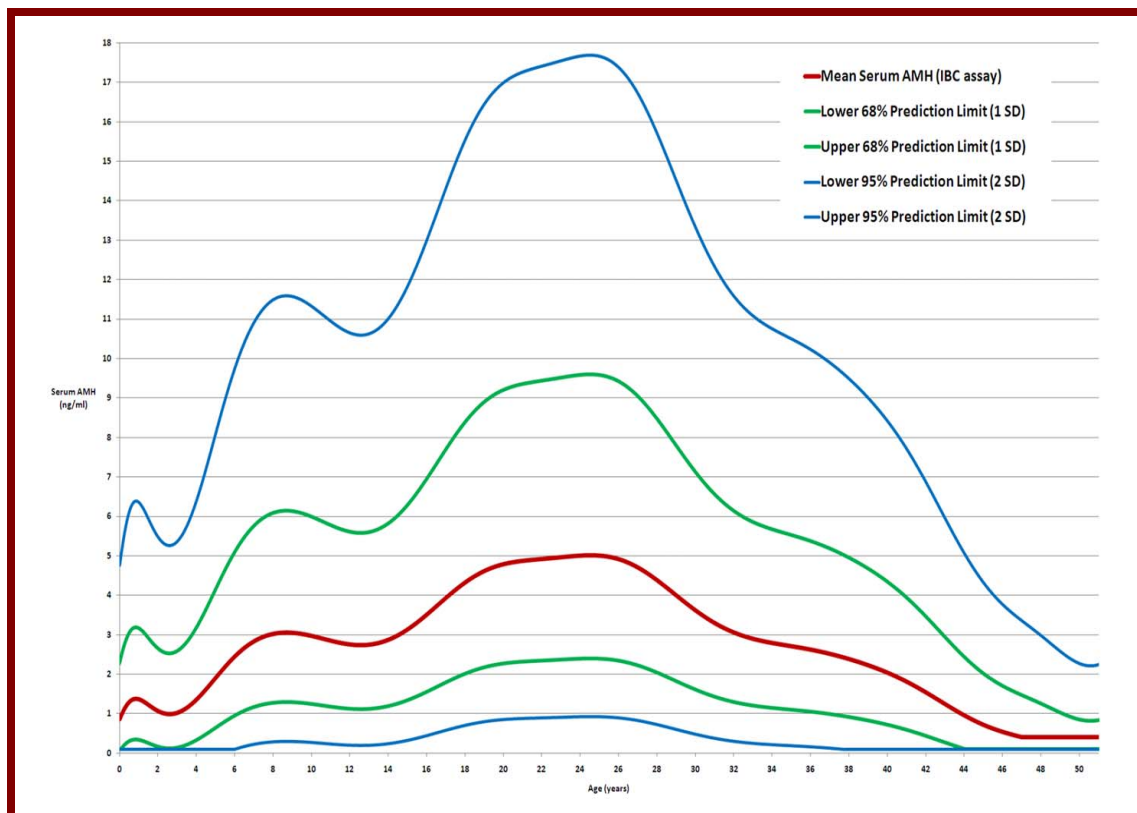


Figura 8. El rango normal de AMH sérica en niñas y mujeres. La línea roja es el modelo de AMH usando el análisis IBC. Las líneas azules y verdes son los límites de

predicción: 68% y 95% respectivamente del modelo (más menos una y dos desviaciones estándar respectivamente). (Kelsey 2011).

Dado que la AMH es producida exclusivamente por los folículos pequeños en crecimiento y secretada a la circulación, sus niveles decrecen parejos al avance de la edad. Los niveles séricos de AMH decrecen significativamente a través del tiempo en mujeres jóvenes normo-ovuladoras, mientras otros marcadores de envejecimiento ovárico, como los niveles de FSH, inhibina B y el RFA, no han sufrido modificación durante el mismo período. Los mecanismos por los cuales se produce el declinar de la AMH son todavía desconocidos. Se ha sugerido que este declinar podría reflejar la reducción en el número de folículos antrales pequeños, debido a la HOS (Laven, 2004). Sin embargo, la disminución en el número de los pequeños folículos antrales podría no ser la única explicación para este fenómeno porque la mayor parte de la secreción de AMH proviene de los folículos preantrales, los cuales no son identificados ecográficamente. Esto sugiere que podría existir un mecanismo adicional en juego, tal como una inhibición activa de la secreción de AMH a partir de las células de la granulosa. Se ha formulado la hipótesis de que altas concentraciones de estradiol podrían tener un rol en el declinar de la AMH, pero esta hipótesis no ha podido ser confirmada (Liberty, 2010).

En otro estudio se ha demostrado que el hiperandrogenismo estaba asociado con un incremento adicional de AMH en mujeres con PCOS (Eldar-Geva, 2005), sugiriendo que el hiperandrogenismo podría afectar a la secreción de AMH en mujeres. Otra posibilidad es que el tratamiento con agonistas de la GnRH cause la disminución de los niveles de AMH. Sin embargo, los hallazgos de Lee et al. (Lee, 2010) apuestan a que existiría un declinar de la AMH tanto en protocolos con agonistas como con antagonistas de la GnRH.

Algunos autores proponen a la AMH como el marcador más sensible de reserva ovárica y envejecimiento ovárico dada su calidad de detección en sangre periférica, su relación con edad, por anteceder a los otros marcadores clásicamente utilizados y por ser secretado únicamente por las células de la granulosa (Hehenkamp 2006).

En humanos, los investigadores han demostrado que los niveles de AMH declinan con la edad, así como sobreviene una caída brusca tras una ooforectomía o después de

una estimulación con gonadotrofinas durante la realización de una FIV. Está así mismo determinada la diferencia en la concentración del líquido folicular entre las distintas edades de la vida reproductiva (de Vet 2002).

De las revisiones que intentan identificar el mejor marcador para caracterizar la reserva ovárica y la respuesta a la hiperestimulación ovárica controlada (HOC), ninguna ha logrado determinar una diferencia en sensibilidad y especificidad entre la AMH y los marcadores clásicos en el capítulo de la reserva ovárica. Sin embargo, sí aprecian una ventaja en cuanto a su precocidad y practicidad de aplicación.

2.2 Correlación de AMH con RFA

Desde que se describió por primera vez la relación entre el incremento de edad y la disminución del RFA, han existido múltiples intentos para establecer la relación entre la reserva ovárica y el RFA. Se asume que el número de folículos antrales originados desde la cohorte de folículos en crecimiento, también se correlaciona con el número de folículos primordiales, o la reserva ovárica (Scheffer 1999). El RFA se define como el número de folículos <10 mm de diámetro detectados por ecografía durante la fase folicular temprana.

El meta-análisis de Hendriks et al. del 2005 incluía 15 estudios para valorar la capacidad predictiva del test (Hendriks 2005). En el análisis de predicción de baja respuesta se encontró que para una LR positiva de 8, la probabilidad post-test de pobre repuesta se acercaba al 70%, considerando la probabilidad pre-test alrededor del 20%. Este resultado es lo suficientemente relevante para considerar el RFA como un test clínicamente válido para la predicción de baja respuesta.

En cuanto a la predicción de no-embarazo, se objetivó que para conseguir LR de 4-5, se necesitaban RFA muy bajos, lo que llevaba a una tasa de gestación post-test de un 5%, tomando como probabilidad pre-test el 20%, situación que se da en un porcentaje de pacientes muy escaso.

Se puede concluir que el RFA no es adecuado para la predicción de embarazo. Sin embargo, sí se considera válido para el screening de la baja respuesta y para reorientar el primer intento de FIV como etapa diagnóstica más avanzada, que aportará datos adicionales acerca de la reserva ovárica (Hendricks 2005). De hecho, el

RFA junto con la AMH están incluidas en los criterios diagnósticos de baja reserva publicados por la ESHRE en 2010 (Ferraretti 2011).

Hoy en día, el RFA y la AMH se han convertido en los pilares predictivo-diagnósticos de reserva ovárica en los tratamientos de reproducción asistida, como consecuencia de la mejora técnica y de la estandarización en sus mediciones que se ha producido en los últimos años. Ambos no solo son buenos marcadores del número de ovocitos recogidos tras la punción en los tratamientos de FIV, sino que, de manera equivalente, nos permiten reconocer a las pacientes, predecir su respuesta ovárica e individualizar los protocolos de estimulación (Nelson 2013).

2.3 AMH y Fallo ovárico Precoz

El fallo ovárico prematuro (FOP) es un síndrome definido como el cese de la función ovárica antes de los 40 años de edad. Está caracterizado por amenorrea asociada a elevación de los niveles de gonadotrofinas y afecta aproximadamente al 1% de las mujeres (La Marca 2006).

La etiología de FOP incluye trastornos genéticos, enfermedades autoinmunes y causas iatrogénicas como quimio o radioterapia. Sin embargo, en mujeres con cariotipo normal 46 XX, la etiología es generalmente desconocida, por lo que esta condición es definida como FOP idiopático.

En la mayoría de los casos, el FOP es irreversible, llevando a la infertilidad a mujeres en edad reproductiva. Los niveles de FSH, E2 o inhibina B tienen un valor limitado para predecir la presencia de reserva ovárica en pacientes con FOP. Siendo la AMH un buen indicador de la presencia de folicular, la detección de este marcador específico, permite confirmar su existencia, y de esta forma facilitar el diagnóstico en estas pacientes, y su diferenciación de aquellos casos de hipogonadismo secundario a un bloqueo ovárico (generalmente inmunológico y conocido como ovario resistente o Savage syndrome).

En otro estudio realizado en pacientes con FOP por Méduri et al. (Méduri 2007), se midieron los niveles séricos de AMH, histología ovárica e in situ expresión de AMH en forma simultánea. Se realizó en 48 pacientes de entre 16 y 39 años objetivándose niveles de AMH menores comparadas con el de las mujeres sin FOP (La Marca 2005).

Hallaron una asociación entre los niveles de AMH y la presencia de folículos antrales en las biopsias ováricas realizada en estas pacientes. La AMH plasmática era significativamente más elevada en pacientes con 15 folículos o más, marcados en la biopsia de ovario, siendo no detectable en el 77% de las pacientes con 0-5 folículos. Encontraron una disfunción en la producción de AMH en los folículos antrales de las pacientes con FOP, sugiriendo un defecto en el desarrollo de los mismos, particularmente en lo que concierne a las células de la granulosa. La disminución en la producción de AMH podría alterar el mecanismo de reclutamiento folicular en estas pacientes.

Al comparar, por inmuno expresión, 40 ovarios de pacientes con FOP y 10 ovarios con ciclos normales en mujeres de edades comparables, el estudio reveló que la inmuno expresión de AMH en pacientes con FOP puede ser normal en folículos preantrales, pero disminuye marcadamente en los estadios antrales iniciales. Esta reducción en la producción de los ovarios con FOP puede tener diferentes causas acorde a la patología antral. En folículos atrésicos de ambos grupos, la expresión disminuida o negativa la de AMH es probablemente secundaria a los cambios apoptóticos de las células de la granulosa. La AMH estuvo siempre ausente en folículos primordiales. Tanto las mujeres normales como las afectas de FOP tuvieron igual expresión de AMH en folículos intermedios, primarios y secundarios. La expresión de AMH en folículos antrales mayores estaba reducida y objetivando ausencia de la misma en cuerpo lúteo normal.

Otro hecho importante es que se han reportado casos esporádicos de embarazos en pacientes con FOP. Siendo la AMH un buen marcador de la presencia de folicular, la identificación de folículos antrales pequeños, no visibles por ecografía, se podría hacer midiendo los niveles de la misma, lo que acaso permitiría discriminar a estas pacientes con folículos capaces de desarrollo y eventualmente de ovulación.

En conclusión, la detección de valores disminuidos o no detectables de AHM permite confirmar el diagnóstico de FOP, como la ausencia de la fuente productora de estrógenos (células de la granulosa), lo que justifica la indicación de una terapia hormonal sustitutiva, para evitar las consecuencias de la carencia estrogénica prolongada.

Valorando otras causas, la reserva ovárica está disminuida en mujeres que han sufrido cáncer en su infancia y que fueron sometidas a quimioterapia, como en aquellas

mujeres que presentan niveles elevados de FSH y disminuidos de AMH, incluso antes de que existan alteraciones claras en la inhibina B y el estradiol (Weenen 2004; Visser 2005). Por tanto, la AMH parece ser el único predictor lo suficientemente sensible para detectar el daño ovárico en un estadio inicial (Fanchin 2003 a y b, La Marca 2006a). Además, tiene el potencial de predecir la aparición de la menopausia (Van Disseldorp 2008).

2.4 Efecto de los anticonceptivos orales en el patrón de AMH.

Los estudios orientados a desentrañar la relación entre el efecto de la supresión de la FSH por efecto de los anticonceptivos y la AMH, muestran que esta hormona también disminuye durante el uso de anticonceptivos orales. Arbo et al. (Arbo 2007) diseñaron para este fin, un modelo de administración de anticonceptivos desde el día 20 del ciclo, evaluando los niveles de FSH y AMH en día 3 del ciclo siguiente. Observaron que la administración corta de anticonceptivos en la fase lútea produce una supresión de la FSH con la obtención de una cohorte folicular más homogénea. Aunque la secreción de la AMH es aparentemente independiente de la FSH, se objetivó una caída en la concentración de la AMH, acompañando al comportamiento de la FSH. La relación fisiológica entre FSH y AMH no ha sido resuelta aún de forma evidente. Estos autores no han logrado demostrar una correlación significativa que justifique que la caída de la AMH sea efecto directo de la FSH, pero sostienen la probabilidad de una relación indirecta. Una explicación aportada por los autores se basa en la fisiología de la concentración de AMH en el líquido folicular. Sostienen que los folículos de mayor tamaño poseen una concentración baja de AMH en relación inversa al aumento de concentración de progesterona intrafolicular. Paralelamente, el efecto de las píldoras anticonceptivas aportarían un ambiente luteínico que no favorecería la producción de AMH.

Se requieren nuevas líneas de estudio en este campo para comprender los eventos que acabamos de exponer.

2.5 AMH en mujeres con Amenorrea.

La Amenorrea Secundaria es definida por la ausencia de sangrado menstrual durante al menos 3 meses. Las causas más comunes son: el Síndrome de Ovarios Poliquísticos (PCOS), el Fallo Ovárico Precoz (FOP) y la Amenorrea Hipotalámica

Funcional (AHF).

El PCOS está caracterizado por ser normogonadotrófico, mientras que el FOP por ser hipergonadotrófico y el AHF hipogonadotrófico.

Dentro de la batería de estudios de estas pacientes se incluyen el perfil hormonal (FSH, LH, E2, andrógenos) y la ultrasonografía. En base a la existencia de una relación entre el pool ovárico folicular y los niveles de AMH, esta última puede proveer información adicional durante el diagnóstico de las amenorreas secundaria. Los niveles de AMH son bajos o indetectable en pacientes con FOP y significativamente altos en PCOS. Pero no existen diferencias significativas en los niveles de AMH entre un grupo control y el grupo de mujeres con hipogonadismo hipogonadotrófico. Tampoco en el número de folículos de 2-6mm. Esto sugiere que el reclutamiento inicial no está abolido en estas pacientes (La Marca 2006a).

En el trabajo de Jonard y Dewailly (Jonard 2005) se evaluaron pacientes con amenorrea funcional comparadas con un grupo control. No encontraron diferencias entre el número de folículos de 2-5 mm (no seleccionables hasta antrales pequeños) pero sí una disminución de los folículos de 6-9 mm (seleccionables), paralelamente a la menor superficie ovárica y al menor IMC. Los valores de AMH fueron superiores en la Amenorrea Hipotalámica Funcional (AHF). Concluyen que el mejor marcador que refleja la insuficiencia de FSH, es la determinación los folículos de 6-9mm, que dependen del aumento intercíclico en mujeres normales. Los niveles de AMH fueron mayores en la AHF que en el grupo control, a pesar de no haber diferencias en los folículos de 2-5mm e independiente de FSH, en contraste con los controles.

Por todo ello, parece claro que la evaluación con AMH es útil como criterio diagnóstico de la amenorrea secundaria, permitiendo distinguir entre la amenorrea WHO clase II (gonadal) y clase III (hipofisaria) (Fleming 2006, La Marca 2006 a y b).

2.6 AMH y embarazo

Las concentraciones de AMH permanecen estables en el embarazo. La Marca et al. en 2005 (La Marca 2005), compararon 84 mujeres no embarazadas y pacientes sanas en el tercer trimestre de embarazo y puerperio. No encontraron diferencias en los valores de AMH observados en la fase folicular del grupo control con el de las gestantes y

puerperio. Proponen que durante el embarazo no está abolida la actividad ovárica no cíclica y que la FSH no jugaría un rol directo en la síntesis y secreción de FSH.

2.7 AMH y Síndrome de Ovarios Poliquísticos

El Síndrome de Ovario Poliquísticos (PCOS) es una de las causas más comunes de anovulación, infertilidad, e insulinoresistencia (IR). El hiperandrogenismo ovárico es responsable de estimular el desarrollo folicular temprano, determina el exceso de 2 a 3 veces el número de folículos de 2-5mm. Este exceso folicular produce incremento de los niveles de AMH que puede ejercer un efecto inhibitor sobre la aromatasa y un deterioro de la acción de FSH y/o una acción prematura de LH sobre los folículos seleccionados en reclutamiento, y mayor producción de andrógenos, teniendo por tanto implicación en la fisiopatología de anovulación de las pacientes PCOS (Massagué 1990, Piltonen 2005).

Como ya se describió, los niveles de AMH están relacionados con el número de folículos antrales. Las mujeres con PCOS poseen un nivel de AMH sérica de 2 a 3 veces superior que las pacientes normales. Esto está presuntamente relacionado con el hecho que las pacientes PCOS poseen un incremento en el número de folículos antrales y preantrales productores de la hormona (Fanchin 2005). AMH podría jugar un rol ptogenético en el status folicular del PCOS (Pigny 2003, Laven 2004).

En un trabajo publicado en el 2005 por Talia Eldar-Geva et al. (Eldar-Geva 2005), se analizaron pacientes afectas de PCOS con hiperandrogenismo (grupo A) y sin hiperandrogenismo (grupo B), frente a un grupo control (C), durante hiperestimulaciones ováricas controladas con FSH. Los resultados mostraron distintos niveles de AMH en los 3 grupos, siendo mayor en grupo A y menor en grupo C. Los niveles de AMH disminuyeron en los 3 grupos durante el tratamiento con gonadotrofinas. No obstante, no fue tan marcado el descenso de AMH con el estímulo externo de FSH en el grupo A. No encontraron diferencias entre AMH e IMC o insulina. Sin embargo, encontraron que en las mujeres con PCOS, el hiperandrogenismo estaba asociado con un incremento extra de AMH, por disrupción en la foliculogénesis, expresado bien por un aumento de folículos preantrales o bien por la afectación directa de las células de la granulosa.

La AMH, la obesidad y la testosterona total están relacionados independientemente

con el número de folículos antrales (Mei-Juo 2008). La obesidad y el índice de resistencia insulínica (IR) poseen un efecto negativo sobre la función de las células de la granulosa. Esta asociación se ha reportado tanto en el PCOS, en mujeres sanas como también en la menopausia. Por tal motivo, se encuentra una asociación negativa entre el índice de resistencia insulínica medido mediante un modelo homeostático (HOMA-IR) y la AMH. Los niveles elevados de AMH, la obesidad, el IR y los niveles elevados de andrógenos contribuirían al mayor tamaño del pool de folículos antrales y al mayor volumen ovárico de las mujeres con PCOS. La disminución de peso, la normalización del IR y la resolución de la hiperandrogenemia, mejoran la morfología del PCOS y modulan la función de la AMH, contribuyendo a la restitución de los ciclos.

Esto confirma la importancia de la producción de andrógenos y AMH en los folículos antrales pequeños. Por el contrario, los niveles de estrógenos poseen una correlación negativa con la AMH, lo que se explica por la inhibición de la enzima aromatasa a cargo de la AMH.

Dentro de las opciones terapéuticas de las pacientes con PCOS, se encuentra la metformina, una biguanida capaz de mejorar el hiperandrogenismo, la IR y la restitución los ciclos ovulatorios. Piltonen et al. en 2005 (Piltonen 2005), publicaron un trabajo donde observaron que el descenso de AMH que aparece fisiológicamente con la edad, se observa en etapas reproductivas más tardías en las pacientes con PCOS. Frente al grupo control, el grupo con PCOS observó una disminución de AMH con la edad, pero siempre manteniendo diferencias 2-3 veces superiores comparadas con su grupo etario. En cuanto al tratamiento con metformina, disminuye los niveles de AMH tanto en el grupo control como en el de PCOS. Esta disminución esta relacionada con la reducción del número de los folículos y del tamaño ovárico, sin que se pueda excluir que también sea subsidiaria a la mejora en la IR, el hiperandrogenismo y los cambios en el patrón ovulatorio. Por lo tanto, los autores consideran que la AMH puede ser útil para evaluar en envejecimiento ovárico, el diagnóstico de PCOS y la eficacia del tratamiento.

2.8 AMH y endometriosis.

La endometriosis se asocia en muchos casos a subfertilidad, ya sea mediante la distorsión anatómica y funcional que conlleva el factor tubo-peritoneal, como comprometiendo la reserva ovárica.

Dentro de este segundo grupo, en los casos de endometriosis moderada y severa, el nivel de inhibina B y el incremento de la FSH han sido descritos como marcadores de compromiso ovárico. A día de hoy, ya no caben dudas de que la AMH juega un papel fundamental en estas pacientes en orden a predecir su reserva ovárica, ya que en algunos casos resulta francamente difícil llevar a cabo una interpretación ecográfica correcta y un RFA aceptable.

Sin embargo, la endometriosis mínima y leve requieren un marcador más sensible, abriendo también un papel a la AMH. Albuquerque Lemos et al. (Albuquerque 2005) llevaron a cabo un estudio prospectivo en pacientes infértiles con endometriosis leve y mínima, en el que se demuestra un descenso en los niveles de AMH, aún con un número de folículos antrales normal, concluyendo que la AMH es el marcador más sensible de reserva ovárica en mujeres con endometriosis en estadios I y II. La cohorte folicular en estas pacientes es heterogénea, deviniendo en pobres resultados tras la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) y en una peor calidad ovocitaria.

2.9 AMH y otras lesiones orgánicas del ovario.

Cuando estudiamos las lesiones orgánicas benignas del ovario, en muchas ocasiones nos encontramos con pacientes jóvenes que aún no han completado su deseo genésico y que, en un porcentaje no desdeñable, tienen que enfrentarse a una cirugía ovárica. Aunque ésta se realice de la manera más conservadora posible, puede disminuir la reserva ovárica en diferentes grados. En estos casos, la AMH puede predecir la severidad del daño ovárico secundario a la cirugía ovárica realizada (Lie Fong 2008; Lutchman Singh 2007).

También se ha demostrado su utilidad en la valoración del daño ovárico secundario a tratamientos de radioterapia y quimioterapia, en las que se ha revelado como un marcador de gran utilidad.

Finalmente, cabe destacar que un tratamiento quimioterápico empleado frecuentemente en nuestro trabajo diario como ginecólogos, el metotrexate, utilizado para el tratamiento no quirúrgico del embarazo ectópico, también puede ser en mayor o menor medida gonadotóxico. Se ha demostrado que la AMH es un marcador eficaz para valorar la reserva ovárica remanente tras dicho tratamiento. Además de que este fármaco permite ser utilizado con relativa seguridad a las dosis protocolizadas, no se

ha demostrado que disminuya la AMH posterior en las pacientes tratadas (Oriol 2008).

2. 10 AMH y cáncer de ovario.

La AMH como marcador de la reserva ovárica, podría encontrar un papel especial fuera de la descripción de la fisiología del envejecimiento ovárico y la infertilidad. Nos referimos a las pacientes bajo tratamiento por cáncer de ovario.

La incidencia de pacientes supervivientes a un cáncer se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas, debido a las mejoras en su diagnóstico precoz y a su tratamiento, de tal manera que un número considerable de ellas se enfrentarán en algún momento a la decisión de poder o no embarazarse. Este hecho ha motivado a oncólogos, pediatras, ginecólogos y otras especialidades afines, a la búsqueda de tratamientos más conservadores del tejido gonadal y con una menor gonadotoxicidad residual.

La extensión del daño ovárico en una paciente sometida a radio o quimioterapia va a depender en principio de la edad de la paciente, las drogas utilizadas y sus dosis. En pacientes con restitución del ciclo menstrual post-tratamiento oncológico, se observa muchas veces la normalización de los niveles séricos de FSH. Sin embargo, su volumen ovárico es mucho menor en comparación con el de las mujeres sanas del mismo rango de edad y, por extensión, también su número de folículos antrales. Estas observaciones indicarían que la FSH o la ciclicidad menstrual no se ajustan como marcadores tan sensibles de la función ovárica (Larsen 2003).

En este sentido, Bath et al. (Bath 2003) han mostrado en pacientes jóvenes tratadas por cánceres de ovario durante su infancia, la disminución de los niveles de AMH, aún sin que aparezca un impacto en la inhibina B, manteniendo sin embargo, algún grado de funcionalidad a pesar de la quimioterapia.

Lie Fong, S. et al (Lie Fong 2008), en un estudio con pacientes con patología oncohemática, demostraron que los niveles de AMH previos al inicio del tratamiento gonadotóxico, no pudieron predecir el grado de afectación gonadal posterior.

En el caso del cáncer de mama, la variación de la AMH evidenciaría la toxicidad ovárica de la quimioterapia de forma más consistente respecto a la inhibina B o los

estrógenos. Esto sugiere la posibilidad de contar con la AMH como marcador de gonadotoxicidad de los diversos esquemas terapéuticos.

Se desprende de lo recién expuesto la utilidad de la AMH para la evaluación de la reserva ovárica residual en pacientes post-tratamiento oncológico, así como el más aproximado asesoramiento sobre la futura fertilidad. Pero además, se convierte en una herramienta eficaz para el estudio de los efectos gonadotóxicos y residuales de los distintos esquemas posibles de tratamiento oncológico. Este conocimiento permitirá a oncólogos, pediatras, hematólogos y ginecólogos, incorporar dentro de la selección del esquema terapéutico no solo el criterio de supervivencia, sino también el de preservación de la fertilidad.

El avance en el conocimiento de la fisiología de la AMH ha estimulado el interés en su posible rol como marcador diagnóstico y terapéutico del cáncer de ovario (Durlinger 2002). Hasta el momento la AMH ha sido descrita con éxito como marcadora en circulación de tumores de la granulosa, con una sensibilidad de entre el 76 y 93%. La AMH parece ser superior a la inhibina y el estradiol (La Marca 2007).

En pacientes tratadas por tumores de la granulosa, la AMH puede utilizarse como marcador de evolución post operatoria y de recurrencia. Tras la cirugía, los niveles de AMH descienden a niveles normales en días o semanas. Niveles reducidos de AMH deben detectarse a la 72 horas de una cirugía exitosa. En pacientes en las que se realizan mediciones seriadas de AMH tras la resección tumoral, el período de tiempo en el que el incremento de la AMH precede a la detección clínica de una recurrencia se ha descrito como de 3 meses.

La Marca A y cols (La Marca 2007) elaboraron la siguiente guía de recomendaciones para el uso de la AMH como marcador tumoral:

~ Altos niveles de AMH se encuentran en el 76 al 93% de los pacientes con tumores de la granulosa.

~ Persistencia de niveles de AMH tras la cirugía indican enfermedad residual.

~ Cuando se realiza un ooforectomía bilateral, los niveles de AMH deben volverse indetectables.

~ Un aumento postoperatorio de AMH indicará recurrencia.

~ AMH debe determinarse cada 6 meses por al menos 5 años tras la cirugía.

~ En casos de tumores de la granulosa juveniles, las mediciones deben realizarse cada mes tras la cirugía, debido a la mayor incidencia de recurrencia en el primer año.

Se ha postulado también que la AMH podría ser aplicable como un agente quimioterápico en el cáncer epitelial de ovario. La AMH induce la regresión de los conductos de Müller, que origina al epitelio superficial del ovario, de donde se originan los tumores de este tipo. Estos tumores presentan una sobre-expresión de receptores para AMH; además, el 50% de las células de la ascitis también expresan receptores para AMH. La inhibición en el desarrollo de estas células se ha demostrado in vitro, suponiéndose relacionada con un bloqueo en el ciclo celular y la activación de la apoptosis (Ha 2000).

2. 11 AMH y su utilidad en procedimientos de fertilización asistida.

En los últimos 20 años, la edad, la FSH (día 3), la LH, la Inhibina B, el recuento de folículos antrales por ecografía, el volumen ovárico y diversos estudios dinámicos han demostrado tener correlación con la respuesta ovárica en los procedimientos de Fertilización Asistida (ART). Sin embargo su valor predictivo hoy en día es controvertido (Banesi 2002).

La medición basal de FSH es el test más comúnmente utilizado para el screening ovárico. Sin embargo, se ha descrito que el aumento de los niveles de FSH aparece en forma tardía en la secuencia de eventos asociados al envejecimiento ovárico. La AMH, ha sido evaluado por varios trabajos como predictor de respuesta ovárica, demostrando ser un valor más sensible para predecir la pobre respuesta ovárica que la FSH y la Inhibina B (Ficicioglu 2006, Eldar-Geva 2005).

Los niveles de AMH parecen reflejar mejor el declinar del pool de folículos paralelo a los años, en comparación con otros marcadores como la FSH o la Inhibina B, considerándose que su sensibilidad y especificidad es equiparable a la del recuento de folículos antrales (RFA) (Nelson 2013). La disminución de AMH a medida que avanza la edad, se presenta antes que los cambios conocidos de la senectud, indicando que los niveles séricos de AMH son el mejor marcador de envejecimiento ovárico. El RFA provee una mejor información pronóstica de baja respuesta ovárica durante los

tratamientos de reproducción asistida (TRA) que los obtenidos con la edad y la FSH. No obstante, la ultrasonografía y su interpretación es operador dependiente y puede no ser constante.

Predecir la reserva ovárica en pacientes que se encuentran bajo procedimientos de reproducción Asistida, es útil para individualizar las probabilidades de éxito del tratamiento, como así también para seleccionar el protocolo de estimulación gonadotrófico optimizando la respuesta.

La causa más común de disminución de la tasa de embarazo es el envejecimiento ovárico. Sin embargo, es de crucial importancia identificar también a aquellas pacientes jóvenes, con ciclos ovulatorios normales, pero con reserva ovárica disminuida, en quienes las posibilidades de embarazo disminuyen con los TRA. Además, en pacientes de edad avanzada, también es muy importante conocer aquellas con mejor reserva ovárica, lo que mejorará sus posibilidades de llegar a conseguir una gestación (La Marca 2011).

Como es difícil determinar en forma directa el tamaño del pool de folículos primordiales, un marcador que represente al conjunto de folículos que han hecho la transición de folículos primordiales al de folículos que han entrado en desarrollo, sería una buena forma de determinarlo indirectamente. La AMH podría ser este marcador por estar involucrada en el proceso de reclutamiento de folículos primordiales.

El registro de la presencia o ausencia folicular (y consecuentemente de ovocitos), determina las perspectivas de fertilidad de las pacientes con reserva ovárica disminuida, como sucede en el FOP, y la posibilidad de efectuar intentos con las diversas alternativas de reproducción asistida disponibles.

La medición sérica de AMH en día 3 del ciclo presenta la mayor sensibilidad del status folicular ovárico, una fuerte relación con el número de folículos antrales y, en base a su comprobada reproductibilidad intercíclica comparada con Inhibina, E2 y FSH, es usada como predictor del número de ovocitos recuperados en la estimulación ovárica de ciclos de Fertilización Asistida (FIV), incluso después de la desensibilización con agonistas GnRh. Una pobre respuesta en ciclo de FIV está asociada con un compromiso de la reserva ovárica y con bajo niveles de AMH (Ebner 2006).

La estimulación ovárica controlada (HOC) consiste en la transformación de folículos antrales en folículos maduros, como resultado del estímulo con Gonadotrofinas

exógenas. Este fenómeno no se produce en un ciclo espontáneo, donde la cohorte de folículos antrales permanece casi intacta y solo un folículo llegará a alcanzar la madures. Los niveles séricos de AMH declinan gradualmente durante un ciclo de HOC, mientras que otras hormonas, como la E2, las Inhibinas B-A y la progesterona se incrementan (La Marca 2004). Se ha sugerido que esto refleja la reducción de los folículos antrales en paralelo con el aumento de los de mayor tamaño, consecuencia de la acción de las gonadotrofinas en su desarrollo. Los niveles de andrógenos como testosterona y androstenediona, aumentan también en la HOC, pero no está claro si su asociación con la AMH es causa o consecuencia. A diferencia de un ciclo normal, la disminución de AMH en un ciclo estimulado tiene una correlación positiva con la disminución de AMH y el incremento y pico de E2 plasmático durante la administración exógena de FSH. Este pico suprafisiológico de E2 ha sido implicado en la down regulation de AMH y ARNm del AMH receptor tipo II. Esta asociación FSH, E2 y AMH no se ha observado en un ciclo espontáneo (Baarend 1995).

Franchin R et al. (Franchin 2003a), diseñaron un trabajo donde evaluaron a 93 mujeres que se hallaban en un ciclo largo de HOC con FSH y agonistas de GnRh. El objetivo fue evaluar los posibles cambios en los niveles de AMH durante la HOC y su posible relación con el desarrollo folicular y las restantes hormonas ováricas. Los niveles de AMH, Inhibina B, E2, progesterona, testosterona y androstenediona fueron medidos tras la desensibilización hipofisaria, a nivel basal, en días 6 y 8 del estímulo de FSH y el día de la administración de hCG. Dividieron los folículos antrales determinados por ecografía en pequeños (<12mm) y grandes (>12mm). Encontraron que los niveles séricos de AMH declinaron progresivamente a través del ciclo, mientras, como se esperaba, las otras hormonas se incrementaron. Los niveles séricos de AMH se correlacionaron con la cantidad de folículos antrales pequeños, pero no con los de mayor tamaño. Se observó una correlación positiva entre AMH e Inhibina B, por estar producidas ambas en los folículos antrales pequeños. No se observó correlación de AMH con las otras hormonas. Los autores explican que durante un ciclo de HOC, la disminución de la AMH, se debe al hecho de que la maduración folicular múltiple produce una disminución dramática del número de folículos antrales pequeños.

Para investigar la dinámica de los marcadores hormonales FSH, Inhibina B, E2, AMH y morfología ovárica por ultrasonografía como predictores de los resultados en FIV, se midieron los mismos en forma basal, así como su comportamiento durante la fase folicular y lútea de un ciclo menstrual, en pacientes estimuladas con FSH (Talia-Eldag-

Geva 2005). El estudio se realizó en 56 mujeres menores de 38 años con valores de FSH basal, en día 3 del ciclo, normal. Los resultados señalaron que las pacientes Bajas Respondedoras (<6 ovocitos) tuvieron niveles significativamente bajos de AMH en fase lútea, mientras que las Altas Respondedoras (>20 ovocitos) tuvieron niveles significativamente altos de AMH, Inhibina B, E2 en fase lútea y mayor recuento en el RFA. El único parámetro que presentó diferencias significativas entre los grupos de mujeres que se embarazaron y las que no, fue la AMH medida en ambas fases del ciclo. Las probabilidades de embarazo en mujeres con niveles séricos de AMH >18 pmol/l o <18 pmol/l fueron del 67 y 39 % respectivamente. En conclusión, en mujeres jóvenes, el RFA, la AMH en fase folicular y la Inhibina B, luego de la estimulación, pueden predecir la respuesta ovárica en FIV, pero sólo la AMH, determinada en fase folicular o lútea, puede ofrecer un pronóstico para predecir la probabilidad de embarazo.

Se debe tener en cuenta que la respuesta ovárica no está sólo reflejada por el tamaño del pool de los folículos primordiales, sino también por la calidad de los ovocitos (te Velde 2002). Las células germinales dependen fuertemente de la salud de su ovocito correspondiente, como también de sus células de la granulosa, lugar de producción de la AMH. Para evaluar el daño en la calidad ovocitaria utilizando los niveles AMH, Ebner et al. realizaron un estudio donde dividieron en 3 grupos a 141 pacientes a las que se les realizó una ICSI, de acuerdo a los valores de AMH en día 3. Subrayan que es el primer estudio que pudo demostrar la relación entre la calidad ovocitaria y los niveles de AMH. Evaluaron morfología de los ovocitos, tasa de fertilización, calidad embrionaria, como así también, FSH, LH y E2. Encontraron que la tasa de cancelación de ciclo estuvo correlacionada con los niveles de AMH. Los grupos con AMH <1.66 ng/ml y >4.52 ng/ml mostraron ovocitos de menor calidad. Describen que la disminución de AMH podría estar asociada con un fallo en la expresión de las células de la granulosa, lo que puede dañar irreversiblemente al gameto. Ni la tasa Fertilización, ni la calidad embrionaria, pudieron ser estimadas utilizando los niveles basales de AMH. Los niveles basales de FSH no permitieron un adecuado pronóstico de la calidad de los gametos. Concluyeron que la AMH parecía ser superior a la FSH a la hora de predecir el número y la calidad de los ovocitos (Ebner 2006).

En otros trabajos posteriores, esta relación entre AMH y calidad ovocitaria no ha podido ser demostrada (La Marca 2011, Khader 2013, Kumback 2009), y parece que los marcadores de reserva ovárica permanecerían independientes a la calidad

ovocitaria, a la embrionaria y a la tasa de abortos.

El RFA y la AMH en conjunto con los marcadores endocrinos de reserva ovárica pueden predecir el número de ovocitos, pero no la calidad ovocitaria. Por tanto, no ha sido descubierto aún un marcador de calidad y solo la edad de la mujer, claramente relacionada con la calidad ovocitaria, ha demostrado ser superior en la predicción de embarazo en los TRA (La Marca 2011). Además, no parece posible establecer un único marcador suficiente para predecir el embarazo, ya que este resultado está adicionalmente influenciado por variantes extraováricas como el factor masculino y las características endometriales.

Otro cuadro importante en las técnicas de reproducción asistida es el Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO) que representa una de las más serias complicaciones subsecuentes a la estimulación ovárica controlada. El riesgo de desarrollar SHO está asociado con factores de riesgo específicos: la edad menor de 35 años, el Síndrome de Ovario Poliquístico, la presencia de múltiples folículos pequeños e intermedios (>35) y los niveles elevados de E2 (>4000 pg/ml) entre otros (Nabot 1992). El valor predictivo para el desarrollo de un SHO a partir de la medición de los niveles séricos de E2 y del número de ovocitos recuperados ha sido cuestionado. Se ha observado la asociación entre SHO y niveles elevados de AMH previo a la estimulación ovárica. Por el contrario, las pacientes en quienes se cancelaron el ciclo por baja respuesta a la HOC fueron aquellas con niveles más bajos de AMH. Tsung et al. (Tsung 2008) estudiaron de forma prospectiva 262 ciclos de FIV con el objetivo de predecir el SHO, previo a la HOC, a través de la determinación de E2, IMC, número de ovocitos recuperados, nivel basal de AMH y edad. Encontraron que el nivel basal de AMH predijo mejor la posibilidad de desarrollar un SHO que la edad y el IMC, con una sensibilidad del 90.5% y una especificidad del 81.3%. Así, también la medición de AMH y E2 el día de la administración de hCG fue un importante predictor del SHO moderado y severo. Basado en esta evidencia, la AMH podría ser útil para predecir el SHO en un ciclo de FIV por ser un apropiado marcador de reserva ovárica y orientar la selección del protocolo más apropiado para la HOC.

2. 12 Comportamiento de la AMH durante el ciclo menstrual.

Recientemente se ha publicado que los niveles de AMH presentan ciertas

fluctuaciones cuando la mujer tiene un ciclo espontáneo ovulatorio normal y cuando es sometida a un tratamiento de hiperestimulación ovárica controlada (HOC).

Estudios previos mostraban que durante los ciclos espontáneos, los niveles de AMH permanecen constantes (La Marca 2004, La Marca 2006b, Hehenkamp 2006) independientemente del momento del ciclo en que se realice la determinación sanguínea. Pero recientemente, Overbeek et al (Overbeek 2012) demostraron que la AMH tiene fluctuaciones en su concentración sérica durante el ciclo menstrual natural, fundamentalmente en el grupo de edad más joven. Robertson et al. (Robertson 2011) publicaron que en la edad reproductiva avanzada, los diferentes patrones de AMH detectados en fase folicular y lútea de ciclos menstruales ovulatorios, podrían reflejar el patrón intermitente de crecimiento de los folículos cerca de la menopausia. Sin embargo, estas fluctuaciones no seguían un modelo consistente.

2.13 Comportamiento de la AMH durante los ciclos de estimulación ovárica controlada

A diferencia de lo que ocurre en los ciclos ovulatorios naturales, los niveles de AMH disminuyen de manera significativa durante la fase folicular de los tratamientos de hiperestimulación ovárica controlada en los que se emplean agonistas de GnRH en protocolo largo (La Marca 2006b). Este descenso ocurre también en pacientes con síndrome de ovario poliquístico, aunque los niveles de AMH no demostraban cambios significativos en los primeros 3-4 días de la estimulación con FSH. Estas mujeres tienen niveles más elevados de AMH basal (Laven 2004), acordes con la presencia de múltiples folículos en diferentes etapas de desarrollo.

Recientemente, se ha evaluado (Weintraub et al 2014) la dinámica de la AMH durante la HOC en protocolos con antagonistas. Estos autores sugieren que en pacientes con PCOS, la AMH presenta un aumento al inicio de la estimulación (días 2º a 6º) y posteriormente, un descenso durante la fase de estimulación ovárica avanzada y en la etapa lútea media. Los niveles de AMH recuperaron la normalidad 2 semanas después de la administración de hCG, independientemente del resultado del tratamiento (gestación o no). Este ascenso inicial podría estar relacionado con el ambiente de hiperandrogenismo presente en algunas pacientes con PCOS.

En la literatura actual, existen muy pocas referencias en relación con una posible medición de AMH durante el ciclo de estimulación ovárica que pudiese ser más

ventajosa para predecir el resultado del ciclo. Es decir, considerando la dinámica que presenta la AMH durante la HOC, podríamos valorar en qué momento de la estimulación esos niveles tienen una relación mayor con el resultado del tratamiento de FIV-ICSI. Lee et al, en el 2010, publicaron la dinámica de la AMH durante ciclos con antagonistas de la GnRH en un grupo de pacientes normorrespondedoras, encontrando una correlación mayor entre los niveles basales de AMH (previos a la administración de gonadotropinas) y los resultados del ciclo valorados en términos de: dosis de gonadotropinas empleadas, niveles de E2 alcanzados el día de administración de hCG, número de folículos >11mm el día de hCG, número de ovocitos obtenidos y número de ovocitos fertilizados. Sin embargo, no lograron establecer una correlación con el número de embriones, la calidad embrionaria, la madurez ovocitaria y las tasas de gestación (Lee et al 2010).

2. 14 AMH como marcador de calidad ovocitaria.

Como ya hemos descrito previamente, la AMH nos ayuda a valorar la reserva ovárica, información fundamental tanto para sentar la indicación de los tratamientos de reproducción asistida, como para ofrecer una información verosímil a las pacientes a la hora de planificar su deseo genésico, orientarlas sobre la edad de la menopausia y valorar el daño ovárico tras los tratamientos quirúrgicos o radio-quimioterápicos.

Pero la correlación de la reserva ovárica con la calidad ovocitaria no está del todo dilucidada. Es más, parece que ambos parámetros siguen un curso independiente; es decir, el número de ovocitos remanentes en el ovario de una paciente no parece tener un descenso paralelo a la pérdida de su calidad.

Desde hace varios años disponemos trabajos en los que se ha intentado correlacionar la calidad ovocitaria con la reserva folicular y la AMH (Ebner 2006), lo que ha generado una cierta controversia al publicarse trabajos con resultados dispares al respecto. Más recientemente, varios trabajos de La Marca et al. han ido orientados en este campo. En el año 2011 (La Marca 2011) publicó un modelo de regresión logística para determinar la tasa de recién nacido vivo (RNV) tras un tratamiento de FIV/ICSI, basado en la edad de la paciente y en la AMH. De acuerdo a este modelo, la necesidad de selección embrionaria se hace más importante a medida que la mujer va cumpliendo años, por lo que una reserva ovárica disminuida siempre representa un handicap.

Aunque reconoce que la edad y la AMH son factores fundamentales e independientes para la tasa de RNV, la edad de la mujer es el primer factor determinante, ya que está directamente asociada a la calidad ovocitaria.

Este modelo fue validado por diferentes autores (Khader en 2013), quienes confirman que, en el grupo con AMH baja, las pacientes <37 años tienen mayores posibilidades de gestación y de nacido vivo que las de edad superior.

Otra forma de relacionar la calidad ovocitaria con la reserva ovárica remanente es la valoración de la tasa de abortos acaecidos en las poblaciones de pacientes que presentan baja reserva ovárica frente a la de de normo y alta reserva, teniendo en cuenta una distribución por edad de la mujer. Kumbak et al. y, unos años más tarde, La Marca et al., publicaron sendos estudios en los que la tasa de abortos en el primero y la tasa de abortos junto con la tasa de RNV en el segundo, no ofrecían diferencias estadísticamente significativas en cada grupo de edad en poblaciones de mujeres con baja y alta reserva (Kumbak 2009, La Marca 2012).

2. 15 AMH en el líquido folicular.

El éxito de un tratamiento de FIV/ICSI depende de múltiples factores, incluyendo la calidad ovocitaria. Sin embargo, la valoración morfológica del ovocito es difícil y parece que poco trascendente. Esta valoración está aún más limitada cuando se decide fertilización mediante FIV “clásica”, ya que en este caso los ovocitos no se limpian del complejo del cúmulo. Por ello, un marcador bioquímico indicador de la viabilidad ovocitaria podría ofrecer una importante información adicional a la valoración morfológica.

El líquido folicular representa el microambiente donde el ovocito crece y se desarrolla. Existen trabajos contradictorios sobre los niveles elevados de estradiol e inhibina B en líquido folicular; no está claro que estén asociados con alta fertilización ni con tasas de embarazo (Otero-Ruiz 1984, Ocal 2004, Wunder 2008, Messinis 1987, Wen 2006, Fanchin 2007, Takahashi 2008, Aflatoonian 2010). Es por esto que sería útil encontrar un indicador directo de la viabilidad/calidad ovocitaria y de las tasas de gestación.

La AMH se secreta en el líquido folicular por las células de la granulosa, y su concentración intrafolicular se ha relacionado con la respuesta folicular (Dumesic

2009), con la calidad ovocitaria con resultados contradictorios (García Velasco 2009, Campos 2010), con el número de ovocitos maduros obtenidos (Jee 2008) y con las tasas de fecundación obtenidas, en cuyo caso también se han obtenido resultados dispares (Cupisti 2007, Takahashi 2008). Así, sería importante clarificar si existe una relación entre las concentraciones de AMH en líquido folicular con las tasas de fecundación, la calidad ovocitaria y las tasas gestacionales.

En una reciente publicación de Mehta et al. en 2013, las pacientes con baja concentración de AMH en LF presentaron mejor calidad ovocitaria (mediante valoración morfológica), fertilización, tasa de gestación clínica y tasa de implantación en comparación con las que presentaron alta concentración de AMH en LF. La concentración de AMH en líquido folicular presentó una correlación inversa con los niveles de E2 en ese medio y con la tasa de gestación clínica. El nivel umbral de AMH en LF para gestación fue >1.750 ng/mg (Mehta 2013).

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO / OBJETIVOS

3.1 Hipótesis de trabajo.

La AMH es una hormona miembro de la superfamilia del TGF- β . Actúa como marcador de la reserva ovárica, así como regulador de la foliculogénesis. La concentración sérica de AMH durante la fase folicular inicial del ciclo menstrual disminuye de manera fisiológica y progresiva con la edad de las mujeres, y de manera paralela a su reserva ovárica. Este fenómeno sucede antes que en los marcadores convencionales de reserva ovárica, tales como la hormona folículo-estimulante (FSH), el estradiol y la inhibina B (Shin, 2008). En estudios recientes se ha demostrado que los niveles séricos de AMH se relacionan con el inicio de la menopausia y con la edad reproductiva de manera más exacta que la edad cronológica (van Disseldorp, 2008).

Se ha investigado la asociación de los niveles basales de AMH y los resultados de HOC. Varios trabajos han demostrado que el nivel de AMH basal (medido en los tres primeros días del ciclo menstrual y previo a la administración de medicación estimulante) se relaciona con el recuento de folículos antrales (RFA), siendo ambos marcadores buenos predictores de la respuesta ovárica al tratamiento de HOC, tanto en pacientes con normo-respuesta como en aquellas con baja o alta respuesta. También, la AMH se ha correlacionado con la dosis total de gonadotropinas utilizada, la duración en días del ciclo de HOC, los niveles de estradiol alcanzados el día de la administración de hCG y el número de ovocitos recuperados en la punción ovárica (Seifer 2002, Muttukrishna 2004).

Algunas publicaciones han encontrado una relación positiva con la tasa de embarazo en ciclos de FIV-TE (Hazoutet al 2004), habiéndose publicado que esta correlación es un factor independiente a la edad de la paciente, ya que la AMH refleja la reserva ovocitaria de la mujer y ambos, edad y reserva ovárica, son los principales factores independientes que se correlacionan con las posibilidades de embarazo (La Marca 2011).

Además, la AMH podría predecir en un ciclo de FIV tanto una mala respuesta, como el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (Nakudaet al 2006, Gnothet al 2008).

Durante los ciclos de HOC, los niveles de AMH séricos presentan fluctuaciones (Fanchin 2003), por lo que podría existir una correlación entre los niveles en algún momento del ciclo y el resultado del tratamiento. Sólo unos pocos estudios han relacionado los niveles de AMH en diferentes días de estimulación (Fanchin 2003, Fanchin 2005, Penarrubia 2005, Silberstein 2006) pero disponemos de muy pocas referencias en relación con una posible medición más ventajosa para predecir el resultado del ciclo (Lee 2010). Por ello, parece importante conocer las variaciones de la AMH durante el ciclo de HOC y valorar en qué momento esos niveles presentan una relación más estrecha con el resultado del tratamiento de FIV-TE. Estas mediciones recogidas durante los días de estimulación ovárica, podrían permitirnos para orientar a nuestras pacientes en los resultados que podrían conseguir, e individualizar así su tratamiento o asesorarlas a la hora de cancelar el proceso.

Para valorar la influencia de la AMH en la foliculogénesis, diversos estudios han analizado los cambios en los niveles de AMH durante el ciclo de HOC, fundamentalmente en ciclos con agonistas de GnRH (Fanchin 2003, Eldar-Geva 2005, Catteau-Jonard 2007). Existen muy pocos trabajos publicados que incluyan dichos niveles en los días cercanos a la administración de hCG, particularmente en ciclos con antagonistas (Lee 2010, Weintraub 2014), y los disponibles recogen un número de pacientes muy limitado.

En nuestro proyecto, el estudio de los niveles de AMH en HOC durante ciclos cortos con antagonistas permitirá correlacionar su fluctuación durante este esquema de tratamiento, evaluar si las variaciones son similares a las publicadas y si aparecen modificaciones según el grupo de pacientes que sean sometidas a tratamiento, es decir, una normo-respondedora, una baja o una alta respuesta.

Por otro lado, nuestro interés también se centrará en investigar si existe una relación entre estas mediciones intracíclicas de AMH con las tasas de embarazo, la calidad ovocitaria y embrionaria, además de otros parámetros de valor pronóstico en el resultado del ciclo. Esto tiene gran relevancia ya que correlacionará estos resultados con una medición de AMH realizada durante el mismo tratamiento de HOC, es decir, midiendo la AMH que se está produciendo durante el crecimiento folicular de los ovocitos que se van a recoger en la punción ovárica. También se pretende analizar el momento del ciclo más relevante para su medición de cara a su valor pronóstico.

Por otro lado, la concentración de AMH en el líquido folicular se ha relacionado con resultados contradictorios con la respuesta folicular (Dumesic 2009), la calidad ovocitaria, (García Velasco 2009, Campos et al 2010), el número de ovocitos maduros obtenidos (Je 2008) y con las tasas de fecundación obtenidas, en cuyo caso también se han obtenido resultados dispares (Cupisti 2007, Takahashi 2008). Así, consideramos que sería importante clarificar si existe una relación entre las concentraciones de AMH en líquido folicular con las tasas de fecundación, la calidad ovocitaria y las tasas gestacionales.

3.2. Objetivos.

3.2.1. Objetivo principal (variable principal).

Evaluar la variación de los niveles de Hormona Antimülleriana (AMH) séricos durante el ciclo de hiperestimulación ovárica controlada (HOC) y sus niveles en líquido folicular el día de la punción ovárica, en pacientes sometidas a tratamiento de HOC para FIV/ICSI, y su correlación con las tasas de gestación clínica.

3.2.2. Objetivos secundarios (variables secundarias de eficacia):

Número y tamaño de los folículos determinados mediante ETV.

Número de días y dosis de estimulación/inhibición.

Niveles séricos de FSH, LH, E2, PRL, TSH, AMH (determinación basal).

Niveles séricos de E2 el día de administración de hCG.

Niveles de AMH en líquido folicular el día de la punción.

Número de ovocitos recuperados.

Número de ovocitos metafase II recuperados.

Tasa de fertilización.

Tasa de embriones de alta calidad (top quality embryos).

Tasa de congelación embrionaria.

Tasa de implantación.

Tasa de embarazo bioquímico.

Tasa de gestación clínica por embrión transferido

Tasa de gestación evolutiva.

3.2.3. Variables secundarias de Seguridad:

Incidencia de acontecimientos adversos.

Tasa de abortos.

Incidencia de SHO.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Diseño y criterios de selección.

Hemos realizado un estudio de cohortes, observacional y prospectivo, en el que se han recogido un total de 46 pacientes que se han sometido a un ciclo de FIV/ICSI con protocolo corto de HOC que incluye antagonistas de la GnRH. Las pacientes han sido recogidas en la Clínica Ginefiv (Madrid) en un período comprendido entre marzo de 2012 y febrero de 2014.

Las pacientes incluidas han sido distribuidas en tres cohortes según su respuesta ovárica:

- 19 pacientes con síndrome de ovario poliquístico (PCOS, según los criterios internacionales de Rotterdam - Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group; 2004).
- 16 pacientes normorrespondedoras, con ciclos regulares, ovulatorios, ovarios ecográficamente normales y niveles hormonales normales en analítica basal (TSH, prolactina, FSH, LH, estradiol).
- 11 pacientes con baja reserva (según los criterios internacionales del Consenso de Bologna 2011 (Ferraretti 2011): mujeres con baja respuesta ovárica previa, definida por la obtención de 3 ó menos ovocitos tras un protocolo de estimulación ovárica estandar; un nivel alterado de marcadores de reserva ovárica.

Como criterios de exclusión se han considerado:

- Haber recibido tratamiento con anticonceptivos durante dos meses previos a la inclusión en el estudio. (Dos meses de lavado).
- Haber recibido tratamiento con gonadotropinas durante dos meses previos a la inclusión en el estudio. (Dos meses de lavado).

- Pacientes que no cumplan estrictamente los criterios de inclusión fijados por las guías internacionales descritas y los criterios exigidos por el centro.
- Factor masculino severo que requiera extracción testicular del espermatozoides.

4.2.- Protocolos de estimulación ovárica.

Se utilizó tratamiento con FSH recombinante (Gonal F, Serono, Herzliya, Israel o Puregon, Organon Ltd, Os, the Netherlands) o HMG (Menopur; Ferring, Kiel, Germany) iniciado desde día 2–3 con una dosis entre 150–225 UI en el grupo de normorrespondedoras, 75–150 UI en el grupo de PCOS, y 300-450 UI en el grupo de baja reserva, según los protocolos establecidos en el centro.

Tras el tercer día de tratamiento, se realizó ecografía de control para ajustar la dosis según la respuesta de la paciente. Cuando un folículo alcanzó tamaño de 13 mm, se añadió el antagonista de GnRH en régimen diario (Cetrotide 0.25 mg, Serono, Switzerland u Orgalutran 0.25mg, Organon Laboratories Ltd., United Kingdom).

Como parte del protocolo de tratamiento FIV/ICSI, se realizaron analíticas sanguíneas de estradiol y progesterona, al igual que ecografías transvaginales para la medición del número y tamaño folicular.

Las mediciones de los niveles de AMH se realizaron en 4 momentos del ciclo:

- Medición de AMH basal: Se han recogido muestras séricas de las pacientes entre los días 1º y 3º de ciclo, antes de comenzar la HOC.
- Medición de AMH sérica en el día del ciclo en el que se indicó la primera dosis de antagonista, siempre de forma previa a su administración.
- Medición de AMH sérica en día de la descarga ovulatoria con hCG, siempre de forma previa a su administración.
- Medición de AMH en el líquido folicular el día de la punción ovárica para la recogida de ovocitos.

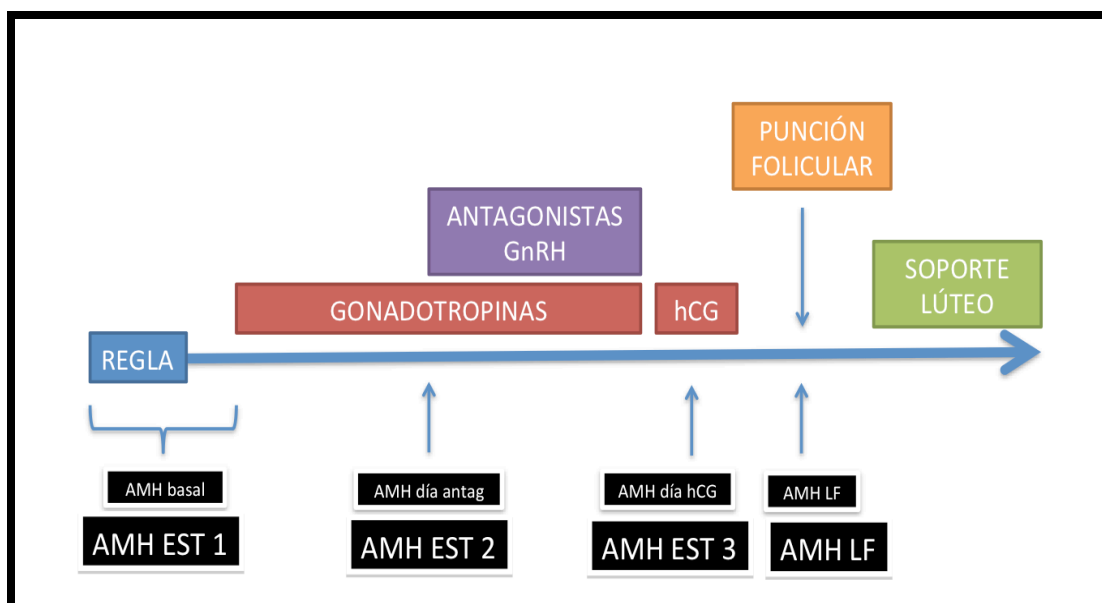


Figura 8: Representación esquemática del protocolo de estimulación ovárica y de los días de recogida de las muestras. Las muestras de sangre se obtuvieron en el ciclo menstrual, la primera entre días 1 y 3 de ciclo (AMH EST 1), el día de administración de los antagonistas de GnRH (AMH EST 2), el día de administración de hCG (AMH EST 3) y en líquido folicular el día de punción ovárica (AMH LF).

Para la transferencia de embriones vitrificados, se han realizado protocolos de preparación endometrial diseñados en el centro. Estos son:

- Preparación endometrial en ciclo natural: se realizan controles ecográficos de la evolución del ciclo ovárico de la paciente en fase folicular, realizando el primer control entre día 8-10 y los siguientes según criterio médico. Administración de hCG recombinante 6.500 UI (Ovitrelle, Serono) cuando el folículo alcanzó los 17mm.
- Preparación endometrial en ciclo sustituido: desde segundo día de ciclo se comienza preparación endometrial con estradiol vía oral o transdérmica (Meriestra 2mg/8 - 12h vo, Novartis farmacéutica; Progynova 2mg/8 - 12h, Bayer Hispania; Estraderm 100-200 / 72h, Novartis farmacéutica). Se consideró endometrio adecuado al objetivarse, al menos, 7 mm de grosor mediante ecografía vaginal.

Los embriones se transfirieron en el día de la fase secretora adecuado según su

desarrollo celular (día +3, +4, +5 de desarrollo) tras, al menos, 24 horas de evolución celular en el laboratorio. Se realizó apoyo de fase lútea con progesterona natural micronizada vía vaginal a dosis de 600mg/día (Utrogestán 200mg, Laboratorios SEID. Progeffik 200 mg, Laboratorios EFFIK).

4.3.- Recogida de muestras en sangre y líquido folicular.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción y procesadas en menos de dos horas. Los tubos de sangre se centrifugaron a 2.000 G durante 10 minutos y se recogió el suero que se almacenó en tubos de polipropileno.

El líquido folicular a analizar se recogió de uno de los folículos con mayor tamaño ecográfico en un tubo independiente al resto de líquidos foliculares, procurando la nula o mínima contaminación hemática.

Tanto las muestras séricas como las muestras de líquido folicular, fueron cricopreservadas y almacenadas en banco en Ginefiv a -20°C hasta la realización del análisis.

4.4.- Análisis hormonal en suero y líquido folicular.

Los niveles de AMH de todas las muestras de suero y líquido folicular se midieron con el sistema GEN II ELISA REF A79765 (Beckman Coulter, USA).

Este sistema es un inmunoensayo de 2 sitios amplificado. En él, los controles de calibración y las muestras se incuban en pocillos de microtitración en los que está adherido un anticuerpo anti-AMH. Tras el proceso de incubación y lavado, el anticuerpo de detección anti-AMH etiquetado con biotina se añade a cada pocillo. Tras un segundo paso de incubación y lavado, se añade HRP (estreptavidina-rábano peroxidasa) a cada pocillo. Tras una tercera incubación y lavado, el sustrato tetrametilbenzidina (TMB) se añade a cada uno de ellos. Por último, una solución ácida de parado es añadida.

El grado de cambio enzimático del sustrato es determinado por una longitud de onda dual a 450 nm y entre 600 y 630 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la

concentración de AMH de las muestras. Dos columnas de controles de calibración se han empleado para realizar una curva de calibración entre absorción versus la concentración de AMH. Las concentraciones de AMH de las muestras se calculan desde esta curva de calibración a través de un proceso informatizado.

La menor cantidad de AMH detectable por este Kit en una muestra con un 95% de probabilidad es 0.08ng/mL. Los coeficientes de variación inter e intraensayo son <15%.

4.5.- Análisis estadístico.

Se han analizado los datos longitudinales de los cambios en suero y en líquido folicular de AMH y las correlaciones entre estas determinaciones y los resultados del tratamiento.

Los valores se presentan en formato de tabla; las variables continuas se representan con la media y la desviación estándar a no ser que se indique lo contrario. Los grupos se compararon usando un modelo ANOVA en el caso de variables continuas y con Test exacto de Fisher en caso de que las variables fueran discretas.

El análisis estadístico se realizó empleando test de Wilcoxon, test exacto de Fisher, U de Mann-Whitney o correlación de Spearman, según fuese necesario. Se utilizó el programa estadístico de software SPSS versión 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para el análisis y los resultados se consideraron estadísticamente significativos con valores de $p < 0.05$.

4.6.- Consideraciones éticas.

La clínica Ginefiv Madrid y la Fundación Ginefiv aprobaron la realización del estudio. Cada participante recibió una explicación en persona sobre los objetivos y los métodos del estudio, en una entrevista con personal médico especializado. Además, cada paciente firmó un consentimiento informado en el que se describía detalladamente el proceso.

Las participantes fueron informadas de la posibilidad de abandonar el estudio si ese fuese su deseo, y de la posibilidad de conocer los resultados de sus determinaciones de AMH si así lo deseaban.

5. RESULTADOS

5.1.- Características clínicas de las pacientes.

Se incluyeron 46 pacientes en el estudio, de las cuales, 19 (41,3%) estaban diagnosticadas de PCOS, 16 (34,8%) eran normo-respondedoras y 11 (23,9%) eran pobres respondedoras (Tabla 1).

Tabla 1: Número de pacientes incluidas en cada grupo de estudio.

GRUPOS DE PACIENTES	FRECUENCIA	PORCENTAJE
PCOS	19	41,3%
NORMO R	16	34,8%
BAJA R	11	23,9%
TOTAL	46	100%

La edad media de las pacientes fue 37 años, sin que hubiese diferencias entre los grupos. Otras características clínicas y demográficas de las pacientes incluidas en el estudio se presentan en la tabla 2.

La edad y el resto de características personales y demográficas de las pacientes distribuidas por grupos de PCOS, normoR y bajaR no han presentado diferencias estadísticamente significativas, pudiendo considerarse homogéneos los grupos, tal y como se describe en la tabla 3.

Tabla 2. Características clínicas y demográficas del total de pacientes.

Edad (años, SD)	37,04 ± 3,1
IMC (Kg/m ² , SD)	21,9 ± 2,6
Antecedentes obstétricos (n, SD):	
• Gestación previa	0,6 ± 1,07
• Abortos previos	0,28 ± 0,7
• Embarazo ectópico	0,2 ± 0,15
• Partos	0,22 ± 0,42
• Vivos	0,24 ± 0,5
Edad menarquia (años, SD)	12,67 ± 1,45
Trat. Reproducción previos:	
• No trat. (%)	40 (87)
• IA (%)	2 (4,3)
• IA + FIV (%)	2 (4,3)
• FIV (%)	2 (4,3)
Causas de infertilidad (%):	
• Masculina	10 (21,7)
• Tubárica	2 (4,4)
• Ovárica	6 (13)
• Uterina	0
• Endometriosis	5 (10,9)
• Esterilidad de origen desconocido	4 (8,7)
• Mixta (factor masc + fem)	19 (41,3)

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de las pacientes distribuidas por grupos.

	PCOS	NORMO R	BAJA R
Edad (años, SD)	35,63 ± 2,8	38,00 ± 3,06	38,09 ± 2,95
IMC (kg/m ²)	22,64 ± 3,41	21,73 ± 2,09	21,14 ± 1,69
Antecedentes obstétricos n, SD):			
•Gestación previa	0,53 ± 1,4	0,7 ± 0,9	0,45 ± 0,52
•Abortos previos	0,32 ± 0,9	0,31 ± 0,5	0,18 ± 0,4
•Embarazo ectópico	0,05 ± 0,23	0	0
•Partos	0,11 ± 0,32	0,31 ± 0,5	0,27 ± 0,5
•Vivos	0,11 ± 0,32	0,38 ± 0,62	0,27 ± 0,47
Edad menarquia (años)	12,47 ± 1,5	12,56 ± 1,63	13,18 ± 0,98
Trat. Reproducción previos (%):			
•No trat.	15 (78,9%)	16 (100%)	9 (81,8%)
•IA	1 (5,3%)	0	1 (9,1%)
•IA +FIV	1 (5,3%)	0	1 (9,1%)
•FIV	2 (10,5)	0	0

En lo referente a los datos hormonales basales, las pacientes del grupo PCOS, presentaron un nivel significativamente inferior de FSH basal en comparación con las pacientes normoR y bajaR (p=0,033). El resto de valores hormonales no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado, las pacientes PCOS presentaron mayor RFA en comparación con las pacientes normoR y bajaR (Tabla 4).

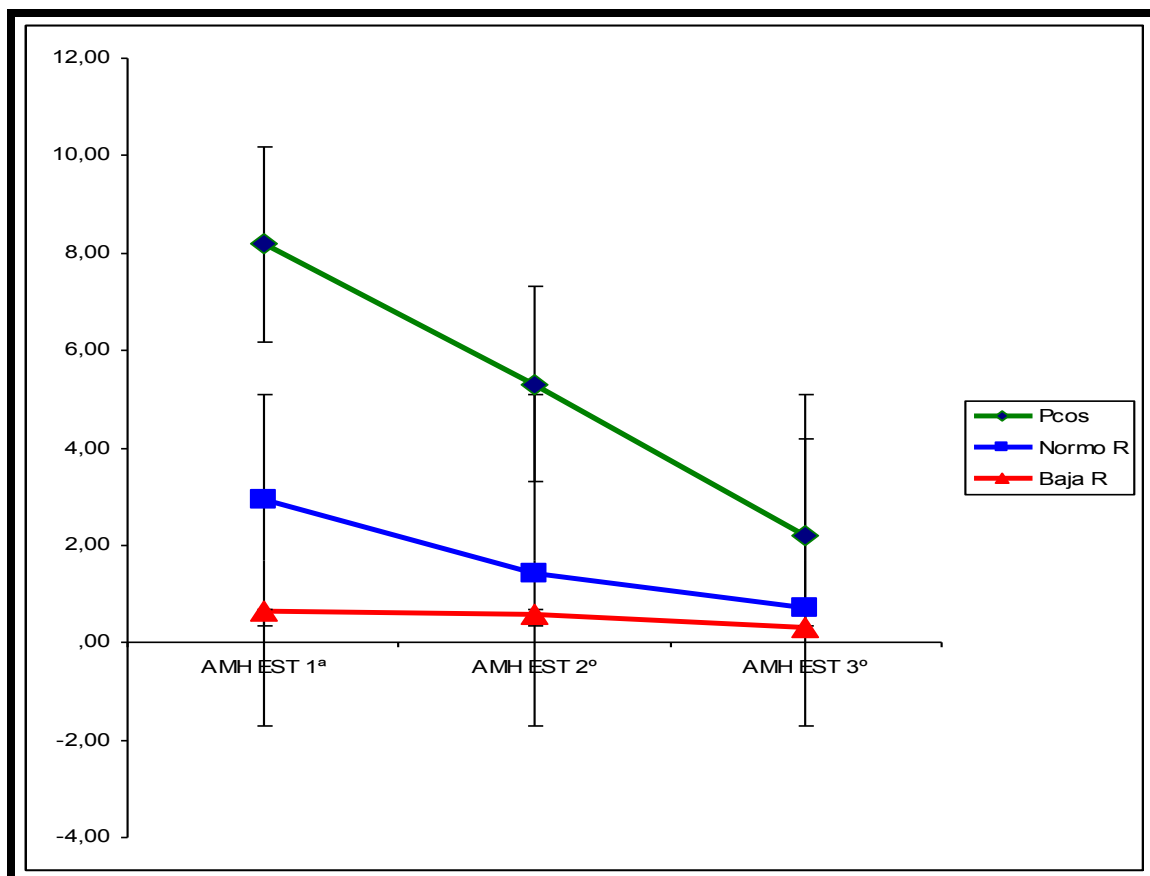
Tabla 4: Datos hormonales basales y RFA según el grupo de paciente. Se han encontrado diferencias significativas respecto al RFA y los niveles de FSH basal en las pacientes PCOS.

	PCOS	NormoR	Baja R	<i>p</i>
TSH	54,21 (22.7)	44,48 (18.24)	53,73 (38.76)	ns
FSH BASAL	5,91 (1.8)	7,81 (2.35)	6,71 (1.93)	0.033
LH BASAL	6,1 (1.7)	5,4 (2.4)	4,6 (1.6)	ns
E2 BASAL	16,57 (7.22)	13,52 (6.94)	17,71 (9.39)	ns
PRL	3,53 (4.01)	26,76 (63.2)	5,92 (4.3)	ns
T4	2,03 (1.16)	2,18 (1.23)	1,38 (0.58)	ns
RFA	21,42 (8.63)	9,31 (3.11)	6,91 (3.42)	<0.0001

5.2.- Dinámica de la concentración de AMH.

Los niveles de AMH descendieron progresivamente durante el ciclo de estimulación ovárica hasta el día de hCG. Los cambios longitudinales en la concentración sérica son significativos en todo el ciclo ($p < 0,001$). El descenso es progresivo a lo largo del ciclo en los tres grupos de pacientes (Gráfica 1). Los valores medios de AMH en suero y LF obtenidos por grupos de pacientes se muestran en la tabla 6.

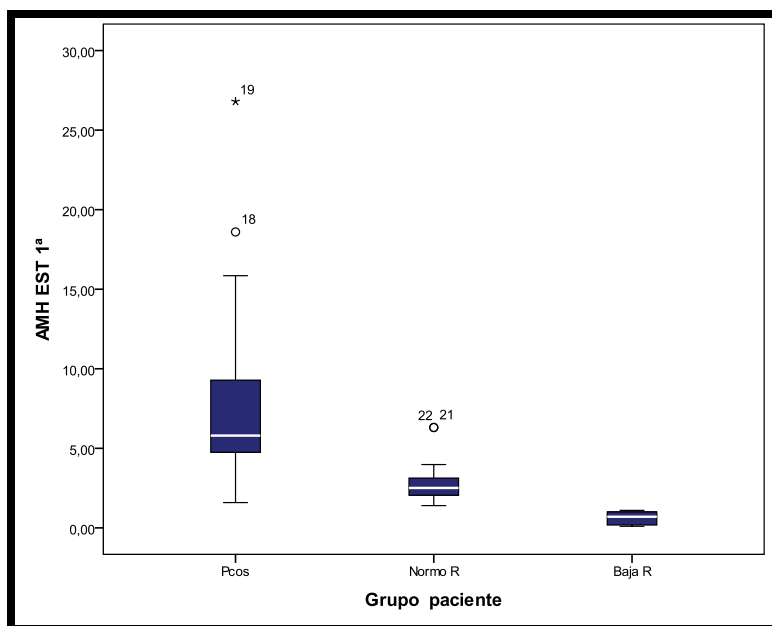
La primera determinación de AMH (AMH EST 1^a), que consideramos como basal del ciclo, en el grupo PCOS tuvo una media de $8,18 \pm 6,26$ ng/ml, de $2,94 \pm 1,53$ ng/ml en el grupo de normoR, y de $0,63 \pm 0,42$ ng/ml en el grupo de bajaR (gráfica 2). Estos niveles basales de AMH fueron significativamente diferentes ($p < 0,0001$) (ANOVA).



Gráfica 1: Cambios de los niveles séricos de AMH a lo largo del ciclo en los diferentes grupos de estudio.

Tabla 6: valores medios de AMH en suero y LF obtenidos por grupos de pacientes.

	PCOS (media \pm SD)	NORMO R (media \pm SD)	BAJA R (media \pm SD)	<i>p</i>
AMH EST 1	8,18 \pm 6,26	2,94 \pm 1,53	0,63 \pm 0,42	<0,001
AMH EST 2	5,3 \pm 3,97	1,44 \pm 0,77	0,58 \pm 0,4	<0,001
AMH EST 3	2,19 \pm 1,31	0,71 \pm 0,77	0,31 \pm 0,2	<0,001
AMH EST LF	3,56 \pm 3,19	4,06 \pm 5,44	1,31 \pm 0,47	ns



Gráfica 2: Diagrama de caja o box plot del valor de AMH EST 1 o AMH basal en los días 1 a 3 de ciclo. La barra blanca de las cajas representa la mediana. Los extremos de la caja representan los percentiles 25 y 75, los bigotes el máximo y el mínimo, excluyendo los outliers, valores que podrían ser error.

5.3.- Correlaciones entre AMH y los resultados del ciclo de HOC.

5.3.1.- Resultados respecto al grupo global.

Los resultados del tratamiento en relación con las mediciones de AMH a lo largo del ciclo se muestran en la tabla 7. Existe una correlación negativa entre la edad y los niveles de AMH en la primera determinación del ciclo, la realizada entre los días 1 y 3, previos a comenzar la estimulación hormonal.

El RFA se correlaciona de manera positiva con los niveles de AMH obtenidos en las tres mediciones realizadas a lo largo del ciclo. También existe correlación positiva con las tres mediciones y el número de folículos obtenidos al final del ciclo, el día de administración de hCG (folículos >11mm). La correlación con la FSH es negativa, como era de esperar, y también significativa en las tres mediciones de AMH.

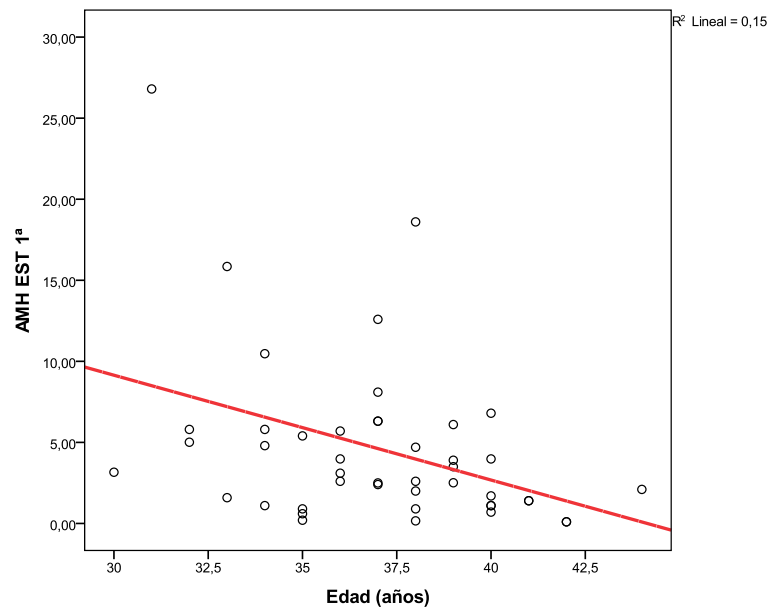
AMH EST 1 y 2 se correlacionan positivamente con el número de ovocitos obtenidos y

el número de ovocitos metafase II recogidos el día de punción folicular. No se ha encontrado correlación con la tasa de fertilización, ni con la tasa de embriones de alta calidad (Top Quality Embryos (TQE), excepto este último con la AMH EST 3. Tampoco hemos hallado correlaciones en los parámetros de resultados del tratamiento con el líquido folicular, y al subdividir los valores de AMH hallados en líquido folicular en los grupos de pacientes no hemos hallado tampoco diferencias estadísticamente relevantes (PCOS: media 3,56 SD 3,11; normoR: media 4,06 SD 5,44; y bajaR: media 1,31 SD 0,42; p = ns).

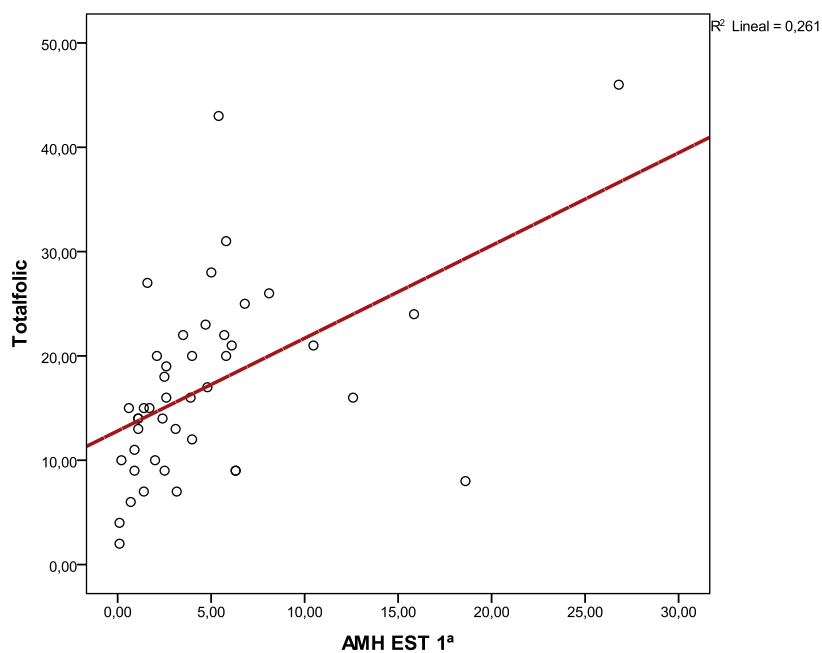
Las correlaciones significativas se muestran en las gráficas 3-15.

Tabla 7: Resultados del tratamiento en relación con las mediciones de AMH a lo largo del ciclo.

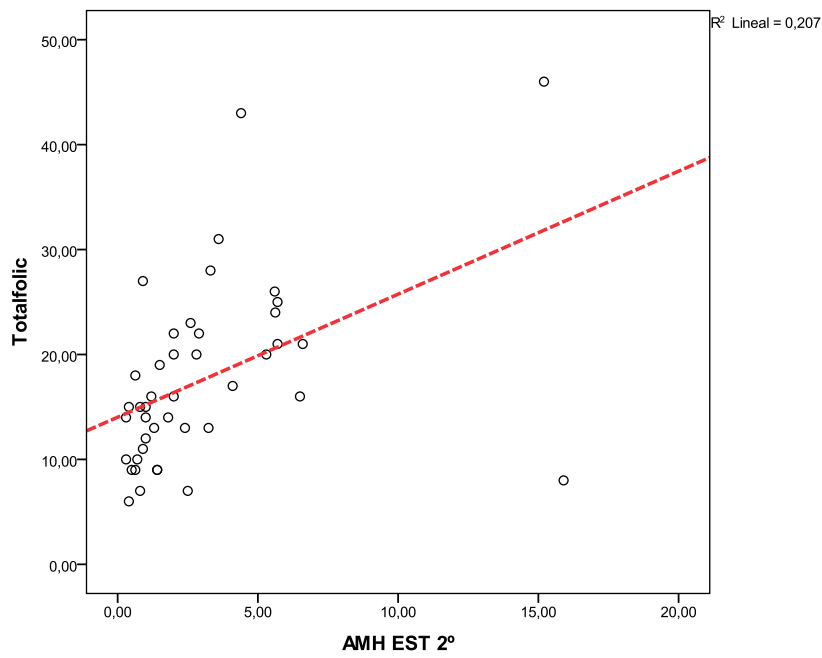
	AMH EST 1		AMH EST 2		AMH EST 3		AMH LF	
	<i>r Pearson</i>	<i>p</i>	<i>r Pearson</i>	<i>p</i>	<i>r Pearson</i>	<i>p</i>	<i>r Pearson</i>	<i>p</i>
EDAD	-0,387	0,009	-0,295	ns	-0,232	ns	-0,124	ns
IMC	0,018	ns	0,093	ns	0,029	ns	0,028	ns
RFA	0,505	<0,00001	0,498	<0,001	0,493	<0,001	0,162	ns
FOLIC >11MM	0,511	<0,00001	0,455	0,002	0,52	<0,001	0,110	ns
DOSIS TOTAL FSH	-0,404	0,024	-0,368	0,042	-0,676	<0,001	0,077	ns
E2 DÍA hCG	0,104	ns	0,138	ns	0,161	ns	-0,288	ns
OVOS OBTENIDOS	0,406	0,008	0,349	0,023	0,314	ns	0,157	ns
OVOS MII	0,57	<0,00001	0,421	0,006	0,287	ns	0,263	ns
TASA FERTILIZACIÓN	-0,083	ns	-0,182	ns	0,013	ns	-0,180	ns
TQE	0,264	ns	0,212	ns	0,334	0,04	-0,07	ns



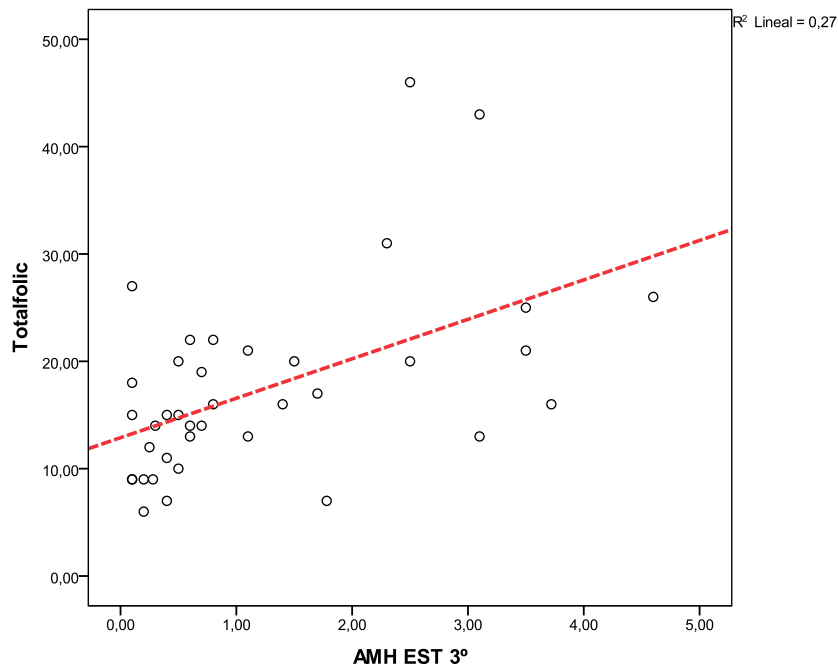
Gráfica 3: correlación negativa entre la edad y los niveles de AMH medidos entre los días 1 y 3 de ciclo (AMH EST 1).



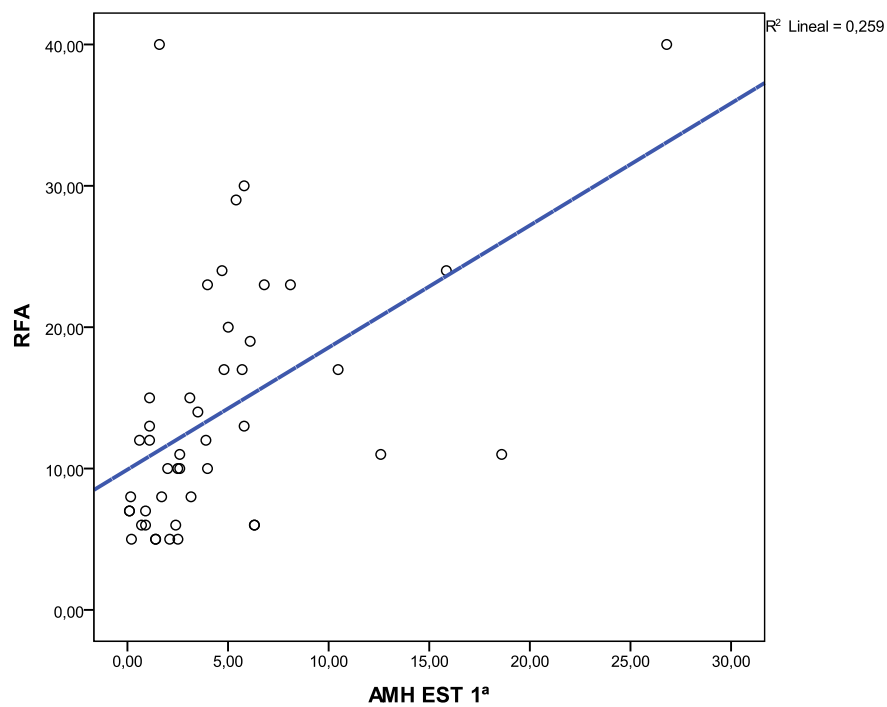
Gráfica 4. Se observa una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la AMH 1 Est y el número de Folículos totales (Correlación de Pearson, $p < 0,001$).



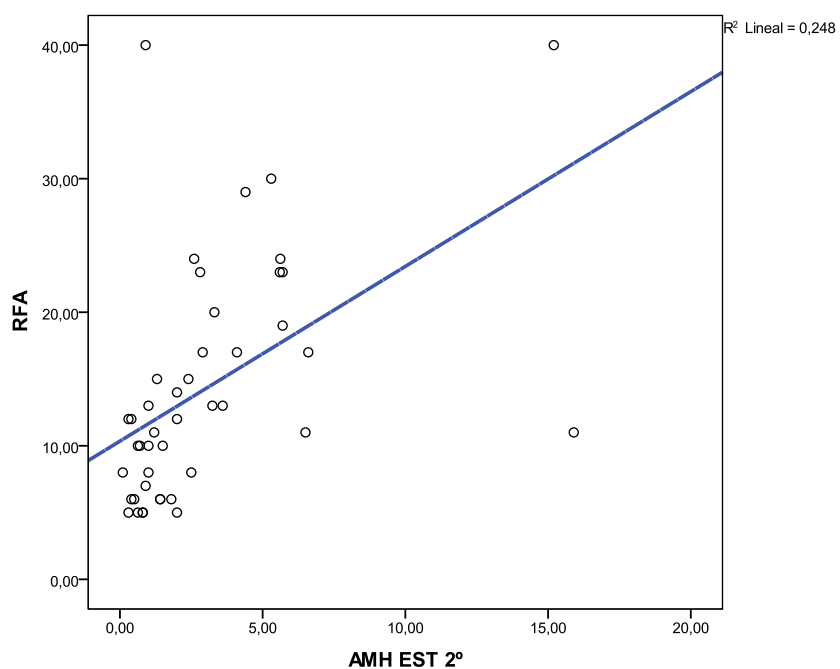
Gráfica 5. Se observa una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la AMH est 2 y el número de Folículos totales (Correlación de Pearson, $p < 0,001$).



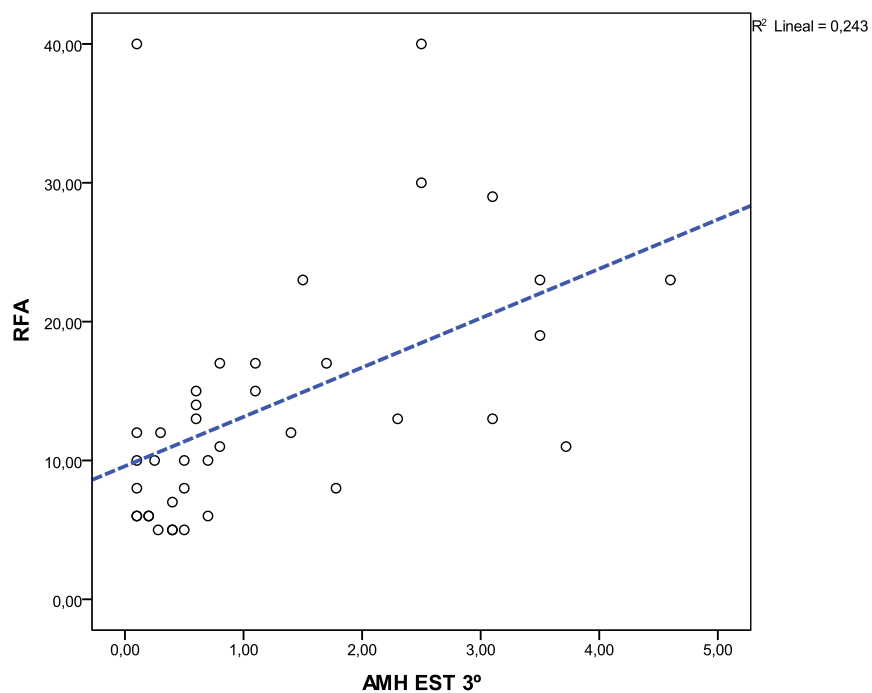
Gráficas 6: se observa una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la AMH est 3 y el número de folículos totales (Correlación de Pearson, $p < 0,001$).



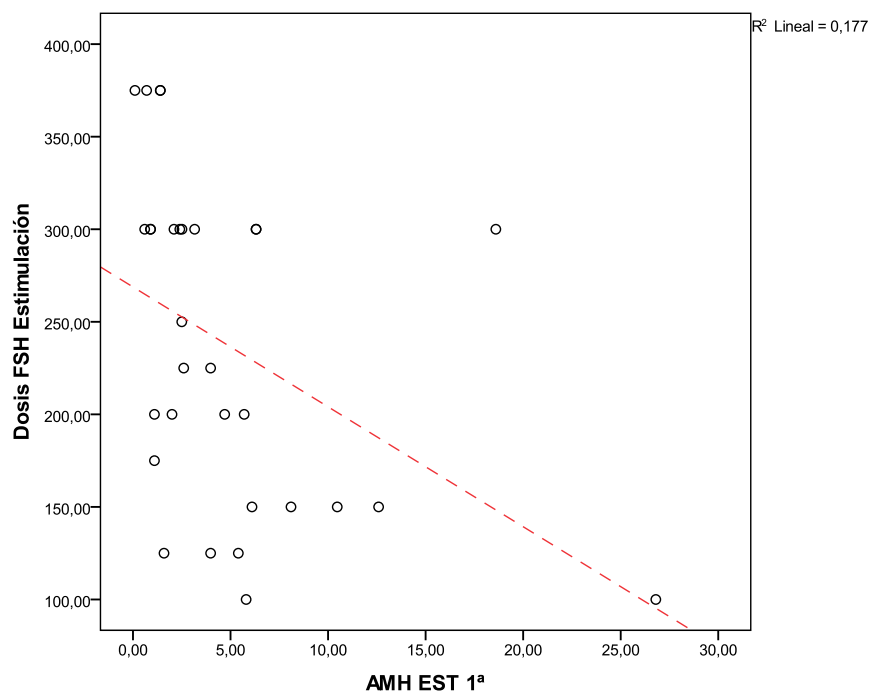
Gráfica 7: El número de folículos antrales se correlaciona positiva y significativamente con los niveles de AMH EST 1.



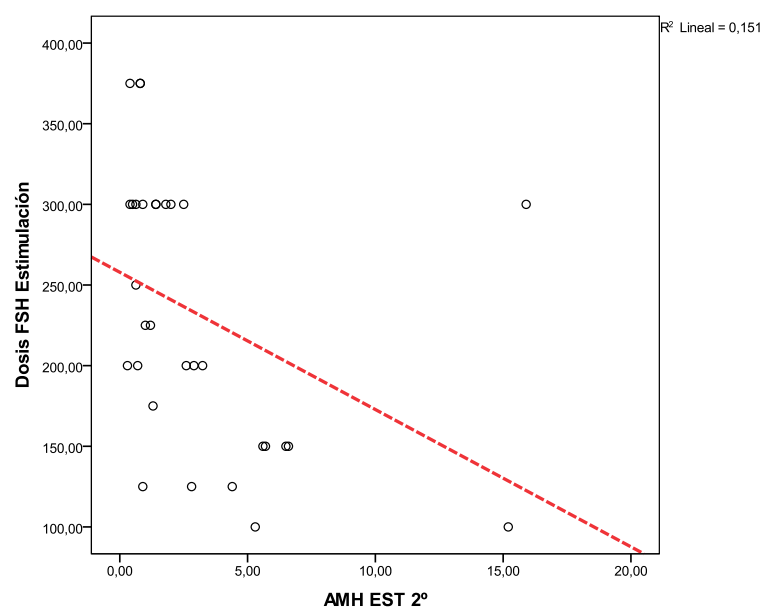
Gráfica 8: El número de folículos antrales se correlaciona positiva y significativamente con los niveles de AMH EST 2.



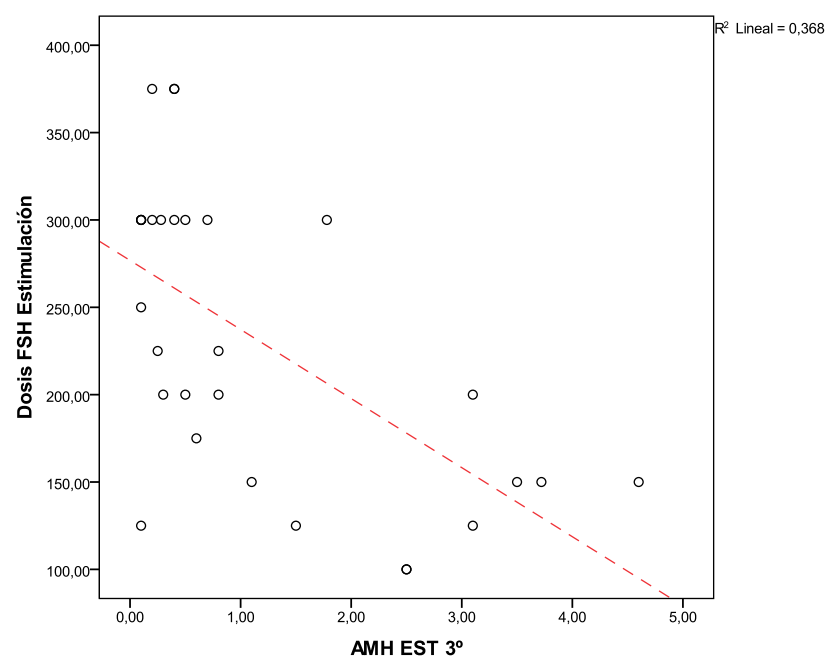
Gráfica 8: El número de folículos antrales se correlaciona positiva y significativamente con los niveles de AMH EST 3.



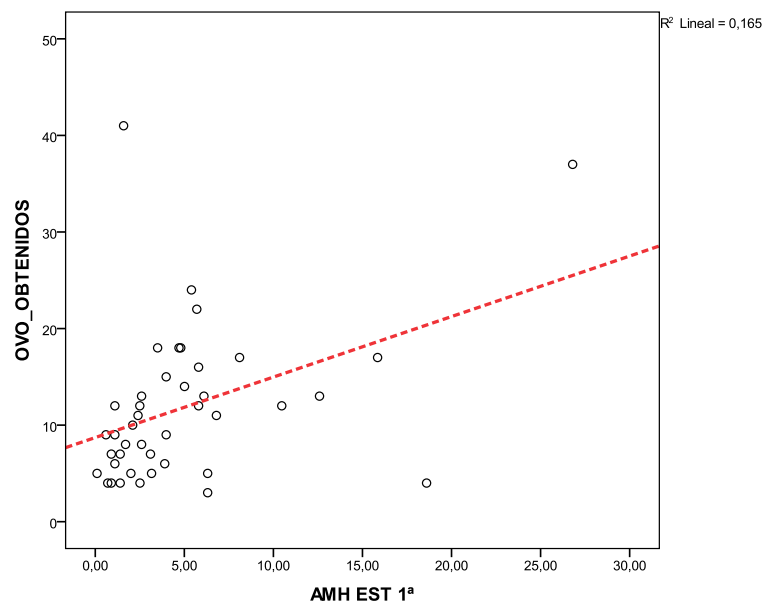
Gráfica 9: correlaciones negativas entre AMH EST 1 con la dosis de FSH utilizada en la estimulación.



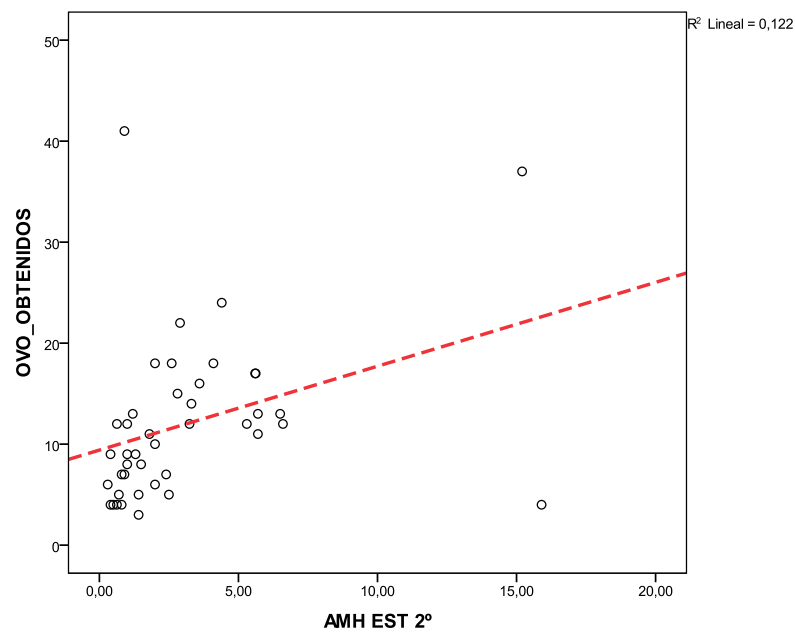
Gráfica 10: correlaciones negativas entre AMH EST 2 con la dosis de FSH utilizada en la estimulación.



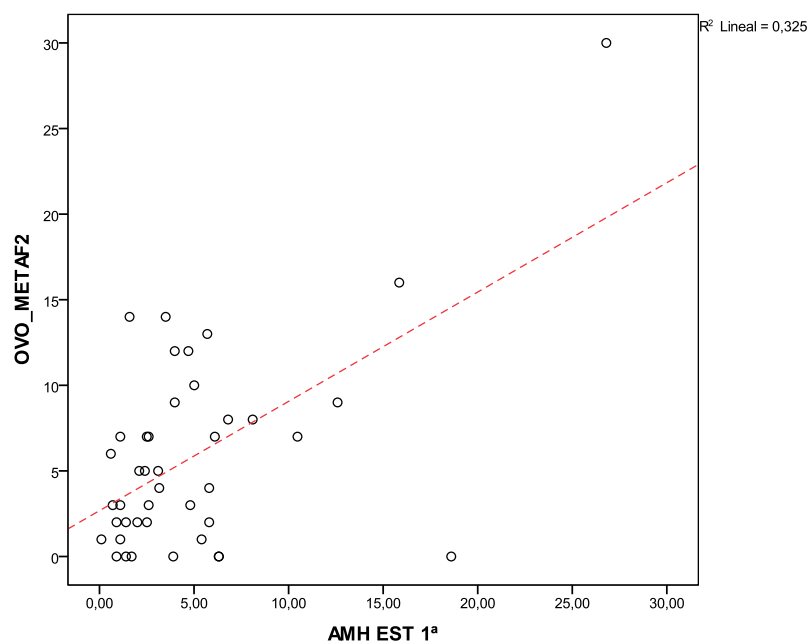
Gráfica 11: correlaciones negativas entre AMH EST 3 con la dosis de FSH utilizada en la estimulación.



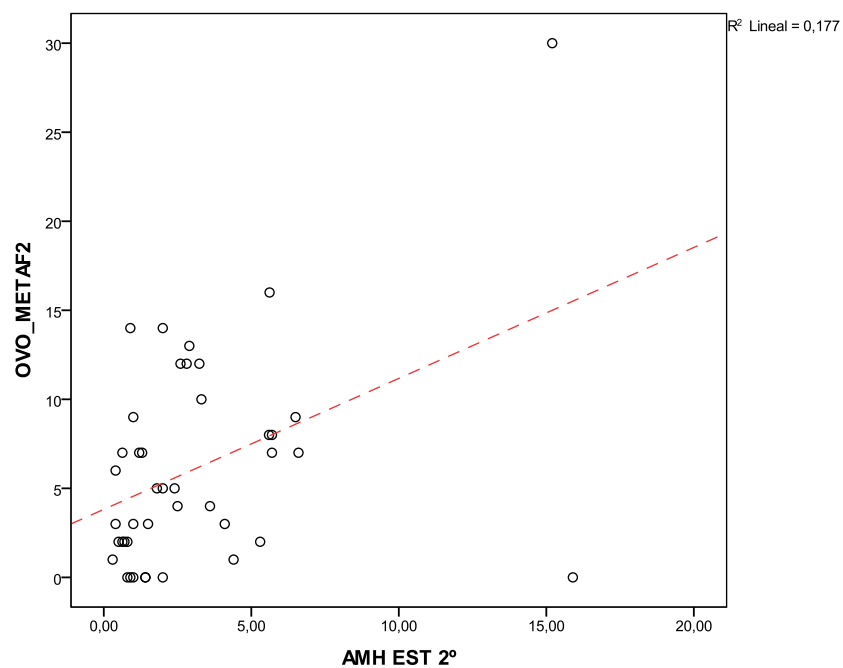
Gráfica 12: Se han encontrado correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre la AMH EST 1 y el número de ovocitos recuperados.



Gráfica 13: Se han encontrado correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre la AMH EST 2 y el número de ovocitos recuperados.



Gráfica 14: los niveles de AMH EST 1 se correlacionaron positivamente con el número de ovocitos metafase II (correlación de Pearson).



Gráfica 15: los niveles de AMH EST 2 se correlacionaron positivamente con el número de ovocitos metafase II (correlación de Pearson).

5.3.2.- Resultados respecto a los parámetros del ciclo de HOC según el grupo de respuesta de pacientes: PCOS, normoR y bajaR.

Como se muestra en la tabla 8 y era de esperar, las pacientes con PCOS presentan mayor número de RFA, de estradiol el día de hCG, de ovocitos recuperados y de ovocitos metafase II. También existen diferencias con la dosis total de FSH utilizada para la estimulación y el nivel de AMH EST 1 (que podemos considerar como AHM basal del ciclo) que presenta este grupo con respecto a los otros dos. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias entre la tasa de fertilización y la tasa de embriones top quality obtenidos en los diferentes grupos de pacientes, todo ello parámetros relacionados con la calidad ovocitaria. Tampoco en tasa de gestación.

Aunque no se ha encontrado significación estadística con la tasa de cancelación, hay una tendencia clara a mayor cancelación por riesgo de SHO en el grupo PCOS y a la cancelación por riesgo de ausencia embrionaria en el grupo de bajaR.

La tasa de congelación embrionaria es más elevada en el grupo de PCOS respecto a los otros dos grupos, y en el grupo de normoR respecto al de bajaR, con diferencias significativas entre grupos. El número de embriones congelados en cada grupo, aunque no alcanzó la significación estadística, fue mayor en el grupo PCOS frente al resto.

No hemos hallado diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aborto hallada en cada grupo.

TABLA 8: resultados del ciclo de HOC. * Diferencias estadísticamente significativas entre grupo PCOS vs normoR y PCOS vs bajaR. ¹ TQE: top quality embryos, representan los embriones de mejor calidad obtenidos, suma de embriones calidad 1 y 2. ² SHO: síndrome de hiperestimulación ovárica.

RESULTADOS	PCOS	NORMO R	BAJA R	p
RFA, media (SD)	24 (8,87)	12,88 (4,15)	9,8 (4,52)	P<0,0001 *
DOSIS TOTAL FSH, media (SD)	1733 (688.6)	3134 (704.9)	3260.7 (1045.2)	P<0,00001*
AMH EST 1, media (SD)	8,18 (6,26)	2,94 (1,53)	0,63 (0,42)	P<0,0001*
E2 DÍA DE hCG, media (SD)	2604.9 (726.6)	2012.9 (1121.3)	1337.2 (329.2)	P<0.004*
Nº ovos recuperados, media (SD)	17,26 (0,04)	7,29 (3,22)	7 (2,5)	p<0,0001 *
Nº ovos MII, media (SD)	8,9 (7,2)	3,9 (3,5)	2,9 (2,5)	P = 0,008
Tasa fertilización, % (SD)	29.8 (17.4)	31.9 (17.5)	44.6 (18.8)	ns
TQE ¹ , media (SD)	2,47 (1,87)	1,44 (1,26)	1,63 (1,84)	ns
Gest clínica, n (%)	2 (20%)	5(35,7%)	5(50%)	ns
Tasa de aborto, n (%)	2/4 (50%)	4/7 (57,1%)	2/7 (28,6%)	ns
Tasa de cancelación (%)	36.8	18.8	36.4	ns
Tasa de cancelación por ausencia de embriones (%)	10.5	6.3	30.4	ns
Tasa de cancelación por SHO ²	26.3	12.5	0	ns
Tasa de congelación embrionaria (%)	84,2	43,8	27,3	p=0,002
Embriones congelados, media (SD)	4.9 (2.8)	2.6 (1.4)	3 (1.7)	ns

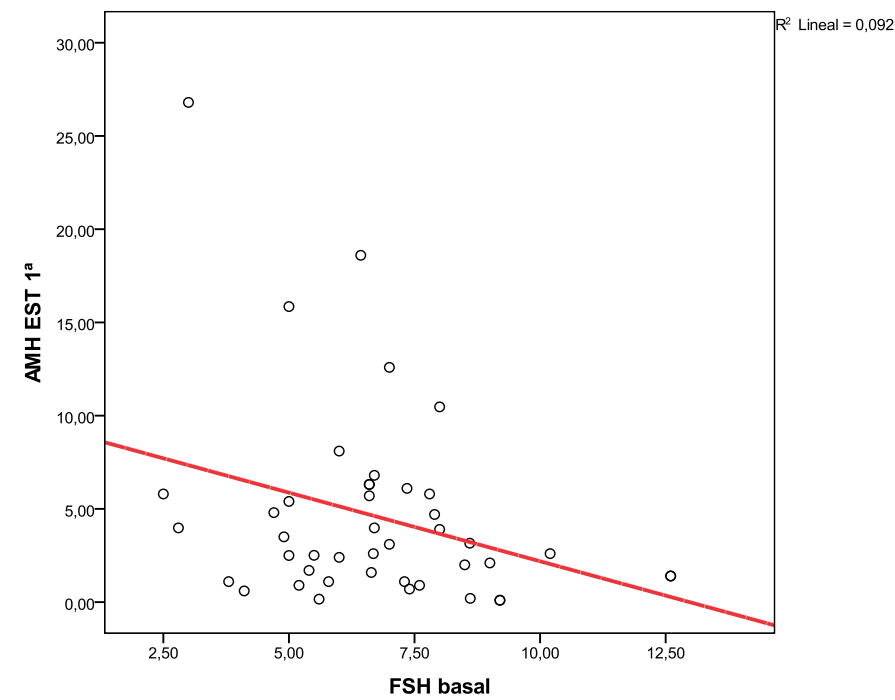
5.3.3.- Comparación entre los niveles intracíclicos de AMH y los niveles hormonales previos en el grupo global de pacientes.

Los niveles de FSH basal de las pacientes, obtenida en fase folicular inicial con anterioridad al inicio del tratamiento, presentan una correlación negativa significativa con la primera medición de AMH del ciclo de estudio (AMH EST1). También existe

una correlación positiva cercana a la significación entre los niveles de LH basal y la AMH EST1 (Tabla 9).

Tabla 9: niveles hormonales previos del total de pacientes respecto a las mediciones de AMH intracíclicas.

	AMH EST 1		AMH EST 2		AMH EST 3		AMH LF	
	<i>r</i> Pearson	<i>p</i>	<i>r</i> Pearson	<i>p</i>	<i>r</i> Pearson	<i>p</i>	<i>r</i> Pearson	<i>p</i>
FSH BASAL	-0,304	0,045	-0,245	ns	-0,162	ns	-0.170	ns
LH BASAL	0,297	ns	0,222	ns	0,171	ns	-0.103	ns
E2 BASAL	0,098	ns	0,119	ns	0,128	ns	-0.162	ns
PRL	-0,022	ns	0,008	ns	-0,118	ns	0.132	ns
T4	-0,323	ns	0,089	ns	0,279	ns	-0.097	ns
TSH	0,041	ns	0,014	ns	-0,290	ns	0.102	ns



Gráfica 16: Existe una correlación negativa y estadísticamente significativa entre los niveles de FSH basal y la AMH 1 Est.

5.3.4.- Comparación entre los valores hormonales basales y los grupos de pacientes.

Los niveles de FSH basal y el RFA fueron significativamente mayores en el grupo PCOS respecto al resto de grupos. El resto de valores hormonales no presentó diferencias significativas.

Tabla 10: Valores hormonales basales y los grupos de pacientes.

	PCOS	NormoR	Baja R	<i>p</i>
TSH	54,21 (22.7)	44,48 (18.24)	53,73 (38.76)	ns
FSH BASAL	5,91 (1.8)	7,81 (2.35)	6,71 (1.93)	0.033
LH BASAL	6,1 (1.7)	5,4 (2.4)	4,6 (1.6)	ns
E2 BASAL	16,57 (7.22)	13,52 (6.94)	17,71 (9.39)	ns
PRL	3,53 (4.01)	26,76 (63.2)	5,92 (4.3)	ns
T4	2,03 (1.16)	2,18 (1.23)	1,38 (0.58)	ns
RFA	21,42 (8.63)	9,31 (3.11)	6,91 (3.42)	<0.0001

5.3.5. Correlaciones con tasas de gestación.

No hemos encontrado correlación entre el valor de AMH EST 1, que representa el valor de AMH basal antes de iniciar el tratamiento de HOC, con las tasas de gestación logradas, ni tampoco al realizar un ajuste de estos parámetros por edad. Tampoco hemos hallado correlación con el RFA realizado ecográficamente al inicio del ciclo.

Tabla 11. Correlación no significativa entre AMH EST 1, AMH EST 2 y AMH EST 3 y las tasas de gestación clínica. La correlación no aumenta cuando se hace ajuste por edad.

GEST CLÍNICA		N	Media	p.
AMH EST 1 ^a	No	22	4,4295	Ns
	— Si	11	2,3782	

Ajuste por edad

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1 ^a	AMHEST1 ^a	-,280	,166	2,847	1	,092	,756
	Edad	-,185	,140	1,740	1	,187	,831
	Constante	7,169	5,474	1,716	1	,190	1299,053

Tabla 12. Correlación no significativa entre RFA y las tasas de gestación clínica. La correlación no aumenta cuando se hace ajuste por edad.

GEST CLÍNICA		N	Media	Desviación típ.	p
RFA	No	22	11,6818	6,65036	ns
	— Si	12	12,6667	7,67917	

Ajuste por edad

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1 ^a	RFA	,009	,056	,028	1	,867	1,009
	Edad	-,076	,130	,348	1	,555	,926
	Constante	2,151	5,139	,175	1	,676	8,590

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: RFA, Edad.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos estudiado los cambios en la secreción de AMH a lo largo de un ciclo de estimulación ovárica con antagonistas de la GnRH para FIV/ICSI en mujeres con diferentes reservas ováricas. La principal novedad de nuestro trabajo con respecto a la literatura publicada reside en la determinación seriada de los niveles séricos de AMH en mujeres con diferentes reservas ováricas y causas de infertilidad. También hemos considerado la determinación de AMH intrafolicular el día de la punción ovárica para la recuperación ovocitaria.

En mujeres con reserva ovárica normal hemos registrado que los niveles de AMH disminuyen de manera progresiva hasta el día de hCG, similar a lo publicado por Lee et al. (Lee 2010). En mujeres con baja reserva hemos visto también una disminución progresiva pero con tendencia a ser más estable hacia el final del ciclo, tal y como también describen Weintraub et al. (Weintraub 2014). Sin embargo, en las pacientes con PCOS hemos visto que la curva es descendente desde el inicio del ciclo, a diferencia de lo descrito por el anterior grupo investigador, quien describe un incremento leve en las pacientes con PCOS en fase folicular inicial. Estos autores recogen 7 casos de pacientes PCOS en su estudio, frente a los 19 casos de pacientes PCOS que incluimos en el nuestro.

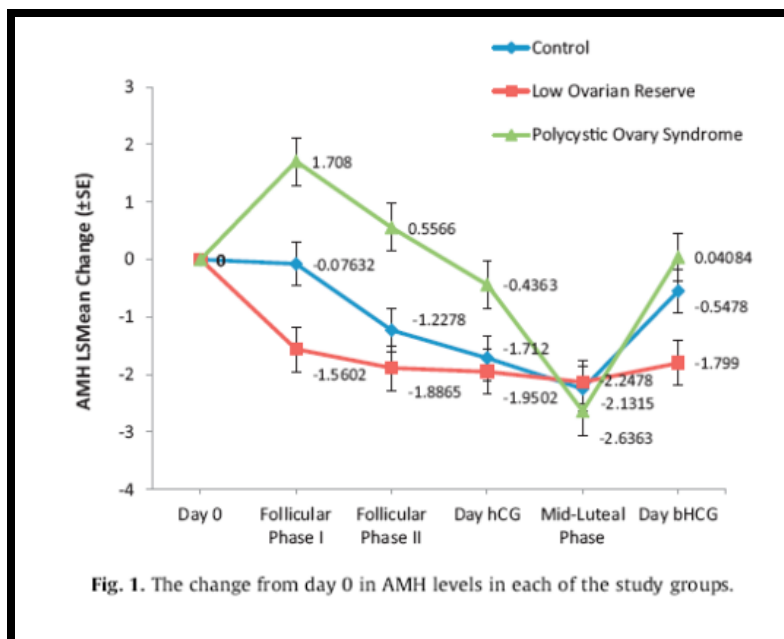


Figura 9: Cambios en los niveles de AMH durante el ciclo de HOC según Weintraub et al. 2014. Este autor describe un leve incremento en el grupo de PCOS (n=7) en fase folicular inicial, que nosotros no hemos encontrado en nuestros casos de PCOS (n=19) en el mismo momento.

El descenso de los niveles séricos de AMH en mujeres con reserva ovárica normal, a lo largo del ciclo de estimulación utilizando antagonistas de la GnRH, es similar a los hallazgos descritos utilizando un protocolo largo con agonistas de GnRH (Eldar-Geva T 2005, Fanchin R 2003). Lee et al. (Lee 2010) describieron concentraciones de AMH en líquido folicular similares en ciclos con agonistas y antagonistas de la GnRH. Por tanto, nuestros resultados confirman estos hallazgos, es decir, podríamos concluir que la GnRH o sus análogos no influyen en el proceso de regulación de la secreción de AMH.

Las pacientes con PCOS presentan niveles significativamente mayores de AMH en suero a lo largo del ciclo de HOC, en línea con lo descrito en la literatura sobre la asociación entre hiperandrogenismo e incremento adicional en los niveles de AMH séricos (Eldar-Geva T, 2005). En nuestro trabajo no hemos discriminado las pacientes con PCOS e hiperandrogenismo asociado frente a las que no lo tuviesen, y aún así ese incremento de AMH en este grupo de pacientes sigue reflejándose.

Las relaciones entre los andrógenos ováricos y la AMH han sido sujeto de múltiples publicaciones en los últimos años. Andersen y Loss (Andersen, 2008) describieron que un incremento en los niveles de andrógenos intrafoliculares ampliaba la producción de AMH por las células de la granulosa en los folículos antrales pequeños. Desforges-Bullet et al. (Desforges-Bullet, 2010) midieron los niveles de AMH en líquido folicular de folículos pequeños (8-13mm) y grandes (16-23mm) obtenido en la punción ovárica. Observaron que en pacientes con PCOS, los niveles de AMH fueron significativamente mayores en relación a los controles, sugiriendo que las células de la granulosa de los ovarios poliquísticos producen continuamente niveles elevados de AMH. Son et al. (Son, 2011) describieron que la AMH juega un importante papel en el proceso de selección del folículo dominante, y que el exceso de AMH en pacientes con PCOS puede contribuir a la foliculogénesis alterada en estas mujeres. Li et al. (Li, 2011) vieron que la secreción de AMH, los niveles abundantes de mRNA y los niveles de receptor II de AMH (AMHR II) eran significativamente mayores en las células de la

granulosa de folículos pequeños no estimulados de mujeres PCOS, comparado con controles. Infieren que este incremento de la actividad promotora está en el origen del exceso de producción de AMH en la granulosa de las pacientes con PCOS. Nielsen et al. (Nielsen ME, 2011) encontraron que en los folículos antrales pequeños (2-9mm), la expresión del mRNA del receptor de andrógenos se correlacionaba de manera significativa con la expresión de AMHRII. La concentración en el líquido folicular de AMH presenta una correlación inversa con la expresión de mRNA del CYP19 (aromatasa) en las células de la granulosa y con las concentraciones de estradiol (Nielsen, 2001), pero una correlación directa con las concentraciones de testosterona (Kedem-Dickman, 2012).

A la hora de evaluar el descenso progresivo que hemos observado en los niveles de AMH durante la HOC en nuestro estudio, resulta difícil explicar el mecanismo de acción de este proceso. Parece existir una correlación entre los niveles de AMH y los folículos antrales pequeños, por lo que se ha sugerido que este descenso podría reflejar la reducción del número de folículos antrales pequeños secundaria a la HOC (Fanchin 2003^a). Pero el descenso en el número de estos folículos no parece ser la única explicación del fenómeno, ya que la mayor parte de la secreción de AMH proviene de los folículos pre-antrales, que no se visualizan ecográficamente. Por tanto, podría existir un mecanismo adicional diferente en juego, del tipo de una inhibición de la secreción de AMH por las células de la granulosa.

Se ha considerado la posibilidad de que la elevación de los niveles de estradiol durante la HOC, podría tener un papel en el descenso de la AMH, pero esta hipótesis no ha podido ser confirmada (Liberty 2010). Como hemos descrito anteriormente, el hiperandrogenismo está asociado a un incremento adicional en los niveles de AMH en mujeres con ovarios poliquísticos (Elgar-Geva 2010), sugiriendo que el hiperandrogenismo puede afectar a la secreción de AMH en las mujeres. Weintraub et al. (Weintraub 2014) estiman que el descenso del ratio andrógenos/estradiol intraovárico durante HOC en pacientes con ovarios normales podría reducir la secreción de AMH, por lo que esto podría explicar en nuestro trabajo el descenso más marcado de la curva de AMH en las pacientes con PCOS y más aplanado en las pacientes con baja reserva. También cabe pensar que la FSH por sí misma contribuye a la inhibición de la secreción de AMH, ya que Li et al. han descrito in Vitro que la actividad del promotor de AMH podría estar suprimida por la FSH (Li 2011). Pero no podemos descartar que otros mecanismos paracrinós y endocrinos del ovario influyan

también en el control de la secreción de AMH, por lo que en los próximos años se hace necesario profundizar la investigación en este campo.

En los ciclos espontáneos no estimulados, no se ha verificado este descenso progresivo de los niveles de AMH séricos de los ciclos con HOC que observamos en nuestro trabajo, ni en las referencias bibliográficas que describimos. La Marca et al. en 2004 (La Marca, 2004), ya publicaron estas diferencias entre ciclos estimulados y ciclos naturales. Pero recientemente, Overbeek et al. (Overbeek 2012) demostraron que la AMH tiene fluctuaciones en su concentración sérica durante el ciclo menstrual natural, fundamentalmente en el grupo de edad más joven, en el que no resulta posible identificar un patrón reproducible. El patrón de secreción es más estable en pacientes de mayor edad. Por tanto, y según estos autores, las concentraciones de AMH pueden fluctuar substancialmente en mujeres jóvenes (≤ 38 años) durante el ciclo menstrual. Aunque de manera general, una única medición de AMH parece tener una alta correlación con la respuesta en los ciclos de HOC, estas variaciones podrían hacer que la precisión de estas medidas no resultara del todo fiable.

Por ello, nosotros proponemos una medición de AMH en un momento determinado del ciclo que vamos a comenzar a estimular, que evite esta variación natural que conllevaría una medición en ciclos previos, y que nos permita tener un valor predictivo adecuado respecto a los resultados que vamos a obtener en el tratamiento de reproducción asistida.

En nuestro trabajo, se observa una correlación positiva potente con las mediciones a lo largo del ciclo y la evaluación del número de folículos en día de hCG, el número de ovocitos obtenidos y el número de ovocitos en metafase II. Si bien es cierto que esta correlación es más potente con la medida en fase folicular precoz (AMH EST 1), los niveles de AMH EST 2 que se miden en fase folicular media (previa a la introducción del antagonista de GnRH) también presentan buenas correlaciones con estos tres parámetros y la medición el día de hCG (AMH EST 3) con el número de folículos $>11\text{mm}$ en ese momento. Además también hemos demostrado una correlación negativa entre los niveles de AMH obtenidos en las 3 mediciones a lo largo del ciclo respecto a la dosis de FSH utilizada.

Estos resultados nos pueden permitir predecir el número de ovocitos que obtendremos en el ciclo, incluso cuando ya estamos en plena estimulación ovárica, es decir, aunque el ciclo de HOC ya esté iniciado podemos reevaluar el caso de cada pareja para

ofrecerles una información predictiva de respuesta altamente individualizada. Esta posibilidad de medir la AMH a lo largo del ciclo de HOC le confiere una ventaja respecto a otros marcadores de reserva ovárica, y la consideramos útil para la clínica habitual. El mecanismo de estas correlaciones, que representan el tiempo de transición de los folículos hasta que se hacen FSH dependientes, no está muy claro aún, y por ello son necesarios más estudios que indaguen en esta correlación.

La medición durante el ciclo que parece tener correlación con mayor potencia estadística es la primera, la AMH EST 1. Esta medición, realizada en fase folicular inicial (días 1-3 de ciclo) del ciclo en el que se va a realizar el tratamiento de reproducción asistida, permitiría ajustar el valor de AMH que se está produciendo por los mismos folículos de los que esperamos crecimiento ecográfico y de los que obtendremos los ovocitos para trabajar, evitando además el error producido por esas posibles fluctuaciones en las determinaciones plasmáticas de AMH del ciclo espontáneo natural, como han descrito Overbeek et al. (Overbeek 2014).

En nuestra muestra, los niveles de AMH medidos durante el ciclo fueron menores en las pacientes con baja respuesta respecto a las normorrespondedoras, y mayores en las pacientes con PCOS. Esto también se ha correlacionado bien con el número de ovocitos recuperados y el número de ovocitos maduros (metafase II), siendo por tanto un buen marcador discriminatorio en la predicción de baja y alta respuesta, como han publicado varios autores (Elgindy 2008, Lin 2014, Tal 2014). A diferencia de estos autores, que mensuraban la AMH en el ciclo natural previo al tratamiento, nuestras mediciones están realizadas dentro del ciclo de HOC, por lo que hemos demostrado un nivel similar de predicción.

Al comparar el valor predictivo de los dos principales marcadores de reserva ovárica entre sí, la AMH y el RFA, disponemos de múltiples estudios publicados con resultados diversos. Broer et al. (Broer 2011) publicaron en el 2011 en un meta-análisis demostrando que ambos son buenos marcadores de alta reserva ovárica. Un meta-análisis anterior del mismo grupo, en 2009, demostró que también son útiles marcadores a la hora de predecir la baja reserva ovárica. Kayakaprasan et al., en el 2010 (Kayakaprasan 2010) concluyen que ambos marcadores son buenos a la hora de predecir el número de ovocitos y los resultados del tratamiento en pacientes con baja reserva. En concordancia con nuestros resultados, Van Rooij et al. (Van Rooij 2002) publicaron que la medición de AMH en fase folicular temprana del ciclo tiene una

capacidad predictiva sobre los resultados del ciclo similar al RFA. Por tanto, nuestra medición de AMH EST 1 vuelve a postularse como un momento clave para realizar la valoración del ciclo de HOC.

Hasta el momento actual, pocos trabajos han descrito el tiempo óptimo de medición de AMH que pueda predecir con precisión los resultados de la HOC. En su mayor parte, además, lo hacen en un lapso de tiempo superior a la administración de gonadotropinas. Peñarrubia et al. (Peñarrubia J, 2005) publicaron que los niveles de AMH en día 5 de estimulación son un mejor predictor de cancelación que los niveles de AMH basales. Silberstein et al. (Silberstein T, 2006) demostraron que los niveles de AMH el día de hCG se correlacionaban con el número de folículos maduros, el número de ovocitos obtenidos y los niveles de estradiol, pero no realizaron comparación con otros momentos del ciclo. Lee et al. (Lee 2010) publicaron una correlación con el RFA, la dosis de gonadotropinas empleadas, el nivel de estradiol el día de hCG, el número de folículos mayores de 11mm el día de hCG, el número de ovocitos recuperados y el número de ovocitos fecundados, apuntando que la correlación era mayor con la medición de AMH sérica realizada en fase folicular inicial, antes de administrar gonadotropinas. Esto apoya nuestros resultados y nuestra opinión de que la AMH EST 1 es un buen marcador predictivo de los resultados del ciclo. Además nosotros hemos demostrado también una correlación con el número de ovocitos metafase II recuperados. Esta medición inicial permitiría además ajustar la dosis de FSH a utilizar en el ciclo, para obtener una respuesta más eficiente. No hay que olvidar que el resultado del análisis se puede obtener, incluso, en el mismo día, lo que permite incluir la AMH realizada en días 1-3 de ciclo para organizar el protocolo de estimulación y como información pronóstica a las pacientes.

Respecto a las tasas de gestación, los niveles de AMH medidos a lo largo del ciclo nos son útiles para predecir el número de ovocitos y ovocitos maduros que podemos obtener, pero no para predecir las tasas de gestación. Y esto tampoco se aprecia cuando dividimos a las pacientes en función de su reserva ovárica, en los grupos PCOS, normoR y baja R. El valor de la AMH para predecir la gestación ha sido investigado en múltiples estudios, pero los resultados han sido diversos: unos trabajos demuestran asociación entre esta hormona y las tasas de fertilización, calidad embrionaria, tasa de gestación y tasa de nacido vivo (Nelson 2007, Majunder 2010, Gleicher 2010, Lehmann 2014) mientras en otros no se ha podido confirmar (Koshy

2013, Riggs 2011, Lie Fong 2008), como ocurre en el nuestro. El metaanálisis y revisión más reciente publicado presenta que el nivel de AMH, independientemente de la edad, tiene asociación con la tasa de nacido vivo tras TRA (Iliodromiti 2014); y además, La Marca et al., (La Marca 2011) publicó un modelo de predicción de tasa de nacido vivo, en el que los factores predictivos fueron AMH y edad, de manera independiente entre ellos. Este modelo es capaz de predecir nacido vivo con una sensibilidad del 79.2% pero una especificidad de sólo el 44.2%. En esta publicación, La Marca identifica a la AMH basal (en fase folicular temprana) como un marcador de reserva ovárica asociado a tasa de nacido vivo en un total de 389 pacientes, y esta asociación es independiente de la edad. Khader et al. validaron en 2013 este modelo de predicción (Khader 2013). Por tanto, de esto podemos inferir, que el éxito de un tratamiento de FIV/ICSI depende principalmente de la edad materna y de la reserva ovárica, siendo la AMH sérica el principal marcador de este segundo parámetro. El tamaño muestral es uno de los principales factores que nos han podido limitar los resultados de nuestro trabajo en este punto.

Sin embargo, nosotros consideramos que las pacientes con baja respuesta de nuestro estudio alcanzan una tasa de gestación razonablemente buena cuando se realiza transferencia embrionaria. Estos resultados van en consonancia con lo publicado por otros autores (Reichman 2014, Lin 2014), por lo que las pacientes con niveles bajos o muy bajos de AMH no deben ser excluidas de un protocolo de FIV/ICSI solamente basándose en sus valores de AMH, aunque deben tener información adecuada de las altas tasas de cancelación de transferencia.

En relación con la valoración de la calidad ovocitaria, la única medida de la AMH durante el ciclo que ha demostrado relacionarse con la calidad embrionaria obtenida es la medición de AMH EST 3, realizada el día de administración de hCG, en la que hemos obtenido una correlación positiva entre los niveles de AMH y el número de embriones de alta calidad (top quality embryos). Hasta el momento, no está claro que un marcador de reserva ovárica, como es la AMH o el RFA, tengan relación con la calidad ovocitaria o embrionaria. Es más, parece que ambos parámetros siguen un curso independiente, es decir, el número de ovocitos remanentes en el ovario de una paciente no parece tener un descenso paralelo a la pérdida de su calidad (La Marca 2011). Es la edad de la mujer la que más se correlaciona con la calidad de sus ovocitos, por lo que se ha demostrado superior a la hora de predecir un embarazo en

FIV/ICSI (Faddy M, 1996).

Hace varios años se publicaron diversos trabajos en los que se intentaba correlacionar la calidad ovocitaria con la reserva folicular y la AMH (Ebner 2006), lo que generó una cierta controversia ya que los estudios mostraron resultados dispares al respecto. En los últimos cinco años, varios trabajos del grupo de La Marca han ido orientados en este campo. En el modelo de regresión logística que publica La Marca en 2011 para determinar la tasa de recién nacido vivo (RNV) basándose en la edad de la paciente y en la AMH, la necesidad de selección embrionaria es más importante según la paciente va cumpliendo años, por lo que una reserva ovárica disminuida es un factor negativo. Y Khader et al, al validar este modelo, confirman que, en el grupo con baja AMH, las pacientes de <37 años tienen mayores posibilidades de gestación y de nacido vivo que las de mayor edad (La Marca 2011, Khader 2013). Hay que tener en cuenta que las pacientes de mayor edad también se van a beneficiar de la precisión con que determinemos su reserva ovárica, la cuál puede tener una variabilidad biológica importante, por lo que perfilar dentro de ese compromiso folicular si su reserva se encuentra en un intervalo más o menos restringido, puede tener influencia en el tipo de estimulación que llevemos a cabo, en orden a intentar obtener un mayor número de embriones con los que poder trabajar en un ciclo de FIV/ICSI, y optimizar así su respuesta.

En los trabajos en los que se ha publicado correlación entre tasa de embarazo y la AMH, esta correlación ha sido sugerida por la asociación de esta hormona con los ovocitos recuperados en la punción ovárica, es decir, a más ovocitos, más embriones para elegir. La Marca, en esta publicación del 2011, discute que el modelo de predicción de RNV tenga correlación con el total de ovocitos recuperados, porque al excluir este factor del modelo, la AMH y la edad fueron los únicos predictores de RNV, por lo que sugiere que la AMH de alguna manera, puede estar correlacionada con la calidad del gameto femenino (La Marca 2011). Brodin en 2013 ha publicado un estudio en el encuentra asociación entre la AMH y las tasas de implantación, de embarazo y de RNV, con una correlación lineal entre ellos. Además, esta correlación se mantiene tras ser ajustada por la edad materna y la recuperación de ovocitos, por lo que afirma, de manera similar a La Marca, que la AMH no sólo es un reflejo a nivel cuantitativo sino también a nivel cualitativo de la reserva ovárica, pero es necesario realizar estudios genéticos que concluyan definitivamente una relación entre los marcadores de reserva ovárica y la calidad ovocitaria y si esa calidad implica mayor número de

ovocitos euploides (Brodin 2013).

Otra forma de relacionar la calidad ovocitaria con la reserva ovárica remanente es la valoración de la tasa de abortos espontáneos en los grupos de pacientes que presentan una baja reserva ovárica frente a aquellos con normo y alta reserva, teniendo en cuenta una distribución por edad de la mujer. Nosotros no hemos registrado diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aborto, ni en el grupo global de pacientes, ni en los subgrupos según la reserva ovárica, probablemente debido a que no tenemos diferencias en la media de edad en los grupos de pacientes. En relación con ello, Kumbak et al. y, unos años más tarde, La Marca et al., publicaron sendos trabajos en los que la tasa de abortos en el primero y la tasa de abortos junto con la tasa de RNV en el segundo, no presentaban diferencias estadísticamente significativas por grupos de edad en mujeres con baja y alta reserva (Kumbak 2009, La Marca 2012).

La correlación positiva que hemos visto entre la calidad embrionaria (top quality embryos) y la AMH EST 3, realizada el día de administración de hCG, es difícil de interpretar al aparecer de manera aislada en esta medición de AMH sérica durante el ciclo, pero no podemos olvidar que el éxito final de un ciclo de FIV/ICSI es el resultado de una multiplicidad de variables en las que la calidad embrionaria es sólo una de ellas.

Tal y colaboradores, también obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de embriones de alta calidad (TQE) obtenidos en pacientes de PCOS, pero con niveles basales más elevados de AMH (Tal et al., 2014). Así mismo, hallaron diferencias significativas favorables con respecto a la tasa de embarazo clínico. Pero el estudio fue retrospectivo en una población más amplia que la nuestra (134) y exclusivamente de PCOS con valores de AMH superiores ($AMH > 10 \text{ ng/mL}$) a los obtenidos en nuestro grupo de PCOS. Los autores observaron una correlación positiva de dichos niveles de AMH con respecto a las tasas de embarazo clínico. El estudio de Lin y colaboradores obtiene unos resultados en línea con los nuestros. Ellos evalúan el nivel sérico de AMH basal como marcador de envejecimiento ovárico precoz en mujeres jóvenes sometidas a ciclos de FIV/ICSI, encontrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al número de embriones de alta calidad (TQE), favorables en mujeres que presentaban una AMH sérica basal $\geq 2 \text{ ng/mL}$, pero sin embargo, no encontraron diferencias significativas en cuanto a la tasa de

embarazo clínico por embrión transferido, abortos, ni tasa de recién nacidos vivos por transferencia (Lin, 2014).

Nuestros resultados podrían hacernos pensar que quizá aquellas pacientes que han experimentado una disminución más acusada del ratio andrógenos/estrógenos a lo largo del ciclo de HOC, y por lo tanto, han sufrido una disminución relativa de AMH más pronunciada, serían las que podrían obtener unas mejores tasas de calidad ovocitaria y embrionaria, es decir, las pacientes con PCOS. Y llegados a este punto, tendríamos que ver si las pacientes de nuestro estudio que han tenido una mayor disminución del ratio andrógenos/estrógenos entre las mediciones basales y las del día de la hCG, son las que realmente han tenido mejores calidades ovocitarias y embrionarias, lo que podríamos evaluar en un trabajo posterior.

Por otra parte, la limitación del tamaño muestral de nuestro estudio y la mayor tasa de cancelaciones en el grupo de mujeres con PCOS que fueron las que presentaron mayores niveles basales de AMH, nos ha impedido dilucidar por el momento estas hipótesis que nos planteamos y determinar una posible correlación entre niveles de AMH y tasas de embarazo clínico.

El líquido folicular representa el microambiente donde el ovocito crece y se desarrolla. Existen trabajos discordantes sobre los niveles elevados de estradiol e inhibina B en líquido folicular; tampoco está claro que estén asociados con una mayor tasa de fertilización ni con superiores tasas de embarazo (Otero-Ruiz 1984, Ocal 2004, Wunder 2008, Messinis 1987, Wen 2006, Fanchin 2007, Takahashi 2008, Aflatoonian 2010). La AMH se secreta en el líquido folicular por las células de la granulosa, por lo que podría ser un marcador directo de la calidad del ovocito. Sin embargo, en nuestra investigación, no hemos encontrado una correlación significativa entre los niveles de AMH en líquido folicular y estos parámetros de resultados. Otros autores han publicado que su concentración en líquido folicular se ha relacionado con la respuesta folicular (Dumesic 2009), la calidad ovocitaria, con resultados opuestos (García Velasco 2009, Campos 2010), el número de ovocitos maduros recuperados (Jee 2008) y con las tasas de fecundación obtenidas, en cuyo caso también se han obtenido resultados dispares (Cupisti 2007, Takahashi 2008). En una reciente publicación de Mehta del 2013, en un estudio realizado en ciclo de estimulación con protocolo largo con agonista de GnRH, las pacientes con baja concentración de AMH en LF presentaron mejor calidad ovocitaria (mediante valoración morfológica), fertilización,

tasa de gestación clínica y tasa de implantación, en comparación con las que presentaron alta concentración de AMH en LF. La concentración de AMH en líquido folicular presentó una correlación inversa con los niveles de E2 en ese medio y con la tasa de gestación clínica. El nivel umbral de AMF en LF para gestación fue >1.750 ng/mg (Mehta 2013). Nosotros no hemos podido corroborar estos resultados en un ciclo con antagonistas de la GnRH, aunque también hay que tener en cuenta que nuestro tamaño muestral es inferior al publicado por este autor (en el estudio de Mehta se han incluido 137 pacientes). Otros autores también sugieren que los niveles de AMH intrafoliculares podrían ser predictivos de las tasas de fertilización ovocitaria y de la calidad embrionaria y encuentran una correlación positiva con las tasas de embarazo (Kim et al., 2014).

Por otro lado, en nuestro estudio, no hemos encontrado diferencias relevantes en los valores del líquido folicular cuando subdividimos a las pacientes en PCOS, normoR y bajaR. Pero nuestros resultados pueden estar limitados porque la recogida del líquido folicular provino de un solo folículo a la hora de la punción, por lo que el nivel de AMH de ese líquido en particular no se vería influido por la reserva ovárica de la paciente sino por la producción intrínseca que se ha producido dentro del propio folículo.

En resumen, pensamos que en base a los datos publicados hasta el momento y a nuestros resultados, la determinación seriada de AMH podría ser de utilidad como factor predictivo de respuesta individualizada al tratamiento y especialmente, la determinación basal (AMH EST1) nos podría facilitar la toma de decisiones en cuanto a la dosis inicial de gonadotropinas en este tipo de ciclos de HOC. Además, el resto de determinaciones plasmáticas seriadas a lo largo del ciclo de HOC quizás podrían ser un factor pronóstico a considerar a la hora de decidir los ajustes sucesivos de dosis y la posibilidad de cancelación del ciclo, tanto por ausencia de embriones como por riesgo de SHO. Por otra parte, opinamos que no podemos desanimar a las pacientes a intentar un tratamiento de FIV/ICSI sólo en base a sus niveles de AMH ya que no hemos encontrado influencias en las tasas de gestación ni abortos.

Finalmente, somos conscientes de las limitaciones de nuestro estudio en cuanto a tamaño muestral, número de subgrupos y diseño como estudio de cohortes. No obstante, si nuestros resultados se confirmasen en futuros estudios aleatorizados, controlados y con mayor tamaño muestral, estos hallazgos repercutirían decisivamente

en nuestros criterios clínicos, en la toma de decisiones y, sin duda, constituirían un factor de alto valor predictivo con respecto a las tasas de gestación y de recién nacidos vivos, que son en definitiva el objetivo principal de nuestra actividad asistencial y la principal satisfacción para estas mujeres.

7. CONCLUSIONES.

1.- En nuestro estudio, las mujeres con reserva ovárica normal presentan, de manera significativa, unos niveles plasmáticos de AMH progresivamente disminuidos a lo largo del ciclo de HOC hasta el día de la administración de hCG, mientras que las mujeres con baja reserva ovárica presentan una disminución progresiva de la AMH plasmática con tendencia a ser más estable hacia el final del ciclo.

2.- En las pacientes con PCOS hemos objetivado que la curva de AMH circulante durante la HOC es descendente desde el inicio del ciclo, demostrándose además en estas pacientes, unos niveles significativamente mayores de AMH en suero a lo largo del ciclo de HOC respecto a las normorrespondedoras y registrándose los niveles más bajos de AMH en las pacientes con pobre respuesta.

3.- En nuestro trabajo no hemos encontrado ningún factor significativo causante del descenso de AMH sérica a lo largo del ciclo. No se explica por el uso de antagonista de la GnRH y sigue siendo controvertido por lo que debe ser objeto de mayor investigación.

4.- Existen fluctuaciones en la concentración sérica de AMH durante el ciclo menstrual natural, por lo que nuestro estudio nos permite deducir que la determinación de AMH sérica en fase folicular precoz y a lo largo del ciclo de estimulación, sirve de ayuda en la modulación de las dosis de FSH a indicar.

5.- Nuestro estudio muestra una potente correlación positiva de la AMH plasmática a lo largo del ciclo con el número de folículos el día de administración de la hCG, el número de ovocitos recuperados y el número de ovocitos en metafase II y es más marcada con la determinación en fase folicular precoz (AMH EST 1). Esta medición de AMH plasmática, secretada por los mismos folículos de los que esperamos un crecimiento ecográfico, nos permitirá iniciar el ciclo de HOC a la dosis de FSH más ajustada para obtener una respuesta más eficiente.

Así mismo, apreciamos que los niveles de AMH EST 2 en fase folicular media (previa a la introducción del antagonista de GnRH) también presentan buenas correlaciones con

estos tres parámetros. No hemos encontrado una correlación significativa entre los niveles de AMH en líquido folicular y los resultados finales del ciclo.

6.- Se demuestra una correlación negativa entre los niveles de AMH obtenidos en las 3 mediciones a lo largo del ciclo respecto a la dosis de FSH utilizada, siendo dicha correlación más pronunciada en las pacientes con PCOS.

7.- En nuestra casuística, la medición de AMH EST 3, realizada el día de administración de hCG, ha presentado una correlación positiva de los niveles de AMH con el número de embriones de alta calidad (top quality embryos), en relación con la calidad ovocitaria.

8.- Los niveles de AMH medidos a lo largo del ciclo en nuestro estudio, no han resultado útiles para predecir las tasas de gestación. Por ello consideramos que no podemos desanimar a las pacientes a intentar un tratamiento de FIV/ICSI sólo en base a sus niveles de AMH.

9.- Nuestro estudio no ha registrado diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aborto, ni en el grupo global de pacientes, ni en los subgrupos según la reserva ovárica distribuida por edad.

8. BIBLIOGRAFÍA

Aflatoonian A, Mashayekhy M, Mohamadian F, Moghaddam FM. The correlation between follicular fluid anti-mullerian hormone levels and fertilization and embryo quality in ART cycles. Iran J Reprod Med. 2010;8:157–60.

Albuquerque Lemos N, Elisangela A, et al; Decreased anti-Müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in fertile patients with mild/minimal endometriosis. Fert Steril 2008; Vol.89, No5:1064-1068.

Allard S, Adin P, Gouédard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC et al. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of β -catenin. Development 2000;127:3349-60.

Al-Qahtani, A., Muttukrishna, S., Appasamy, M., Johns, J., Cranfield, M., Visser, J.A., Themmen, A. P., Groome, N.P., 2005. Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-Mullerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females. Clin. Endocrinol. (Oxf) 63, 267-273.

Andersen CY, Lossl K. Increased intrafollicular androgen levels affect human granulosa cell secretion of anti-Mullerian hormone and inhibin-B. Fertil Steril 2008;89:1760–5.

Arbo E, Vetori DV, et al; Serum anti-Müllerian hormone levels and follicular cohort characteristics after pituitary suppression in the late luteal phase with oral contraceptive pills. Hum Rep 2007; Vol.22,No12:3192-3196.

Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Post M, Visser JA, De Rooij DG, Parvinen M et al. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. Endocrinology 1995;136:5614-22 b.

Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP et al. Anti-Müllerian hormone and anti- Müllerian hormone type II

receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995;136:4951-62 a.

Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development* 1994;120:189-97.

Baker ML, Metcalfe SA, Hutson JM. Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years, as determined by enzyme immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70, 11-15.

Balasch, J. Investigation of the infertile couples: investigation of the infertile couple in the era of assisted reproductive technology. a time for reappraisal. *Hum Reprod* 15; 2000: 2251-2257.

Banesi LF, et al.; Predictors of poor ovarian reponser in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77:328-36.

Banu Kumbak, M.D., Ulun Ulug, M.D., Burcak Erzik, M.D., Hande Akbas, M.D., and Mustafa Bahceci, M.D. Early clinical pregnancy loss rate in poor responder patients does not change compared to age-matched normoresponders. *Fertil Steril* 2009;91:106–9.

Bath LE, Wallace W, et al; Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibina B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod*, 2003; Vol.18, No2:2368-2374.

Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994;79:415-25.

Bézard J, Vigier B, Tran D, Mauléon P, Josso N. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and postnatal development. *Reprod Fertil* 1987;80:509-516.

Botero-Ruiz W, Laufer N, DeCherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil Steril*. 1984;41:820–6.

Brodin T, Hadziosmanovic N, Berglund L, Olovsson M, Holte J. Antimüllerian hormone levels are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab* 2013, 98(3): 1107-1114.

Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006; 12: 685-718. Review.

Budak, E, y otros. Improvements achieved in an oocyte donation program over a 10-year period: sequential increase in implantation and pregnancy rates and decrease in high-order multiple pregnancies. *Fertil Sterility* 2007: 342-349.

Budzik GP, Donahoe PK, Hutson JM. A possible purification of Müllerian inhibiting substance and a model for its mechanism of action. In: Lash JW y Saxèn L, editor. *Developmental mechanisms, normal and abnormal: progress in clinical and biological research*. 1985. p. 207-23.

Budzik GP, Powell SM, Kamagata S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance fractionation by dye affinity chromatography. *Cell* 1983;34:307-14.

Callejo J and Coroleu B. *Fallo ovárico prematuro*. Buenos Aires; Madrid. Ed. Médica Panamericana; 2007.

Campo R, Gordts S, Brosens I. Minimally invasive exploration of the female reproductive tract in infertility. *Reprod Biomed Online*. 2002;4 Suppl 3:40-45.

Campos CS, Vaamonde D, Andreoli C, Martins AC, Genro VK, Souza CA, Chapon R, Cunha-Filho JSL. Follicular-fluid anti-Müllerian hormone concentration is similar in patients with endometriosis compared with non-endometriotic patients. *Reproductive BioMedicine Online* 2010;21:470-473.

Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the

human gene in animal cells. *Cell* 1986;45:685-98.

Cate RL, Ninfa EG, Pratt DJ, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Development of Müllerian inhibiting substance as an anticancer drug. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51:641-7.

Cate RL. Müllerian inhibiting substance. In: Sporn MB RA, editor. *Peptide Growth Factors and their Receptors II. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin:1990. p. 179-210.

Catteau-Jonard S, Pigny P, Reyss AC, Decanter C, Poncelet E, Dewailly D. Changes in serum anti-müllerian hormone level during low-dose recombinant follicular-stimulating hormone therapy for anovulation in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4138–4143.

Chen YM, Ott DJ, Pittaway DE, et al. Efficacy of hysterosalpingography in evaluating tubal and peritubal disease in 200 patients with infertility. *Rays* 1988; 13: 27-32.

Cupisti S, Dittrich R, Mueller A, Strick R, Stiegler E, Binder H, Beckmann MW, Strissel P. Correlations between anti-müllerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. *Eur J Med Res*. 2007;12:604-608.

Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*. 2008; 89(6):1657-64.

de Vet A, Laver JS, et al; Antimüllerian hormone serum level: a putative marker for ovarian ageing. *Fertil Steril* 2002;Vol. 77, No.2: 357-362.

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK et al. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transforming cells. *Nature* 1985;318:659-63.

Desforges-Bullet V, Gallo C, Lefebvre C, Pigny P, Dewailly D, Catteau-Jonard S. Increased anti-Müllerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained

in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010;94:198–204.

di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R et al. Cloning, expression and alternative splicing of the receptor for anti- Müllerian hormone. *Mol Endocrinol* 1994;8:1006-20.

di Clemente N1, Ghaffari S, Pepinsky RB, Pieau C, Josso N, Cate RL, Vigier B. A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Development*. 1992 Mar;114(3):721-7.

Donahoe PK, Budzik GP, Trelstad R, Mudgett-Hunter M, Fuller A Jr, Hutson JM et al. Müllerian inhibiting substance: an update. *Recent Prog Horm Res* 1982;38:279-330.

Donahoe PK, Cate RL, MacLaughlin DT, Epstein J, Fuller AF, Takahashi M. Müllerian inhibiting substance: gene structure and mechanism of action of a fetal regressor. *Recent Prog Horm Res* 1987;43:431-67.

Donahoe PK, Ito Y, Morikawa Y, Hendren WH. Müllerian inhibiting substance in human testes after birth. *J Pediatr Surg* 1977;12:323-330a.

Donahoe PK, Ito Y, Price JM, Hendren WH 3rd. Müllerian inhibiting substance activity in bovine fetal, newborn and prepuberal testes. *Biol Reprod* 1977;16:238-43b.

Dumesic DA, Lesnick TG, Stassart JP, Ball GD, Wong A, Abbott DH. Intrafollicular Antimüllerian Hormone (AMH) levels predict follicle responsiveness to FSH in Normoandrogenic Ovulatory Women Undergoing GnRH analog/Recombinant Human FSH therapy for IVF-ET. *Fertil Steril* 2009;92(1):217-221.

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002;143, 1076-1084.

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM et al. Anti-müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142:4891-9.

Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegeed JA et al. Durlinger AL KPKBea. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789-96.

Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 2002;124:601-9.

Durlinger AL. Ovarian follicle growth and development: role of anti-Müllerian hormone. Faculty of medicine and health sciences, Erasmus, Rotterdam; 2000.

Ebner T, et al.; Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod* 2006;21:2022-6.

Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Gal M, Ben-Chetrit A, Algur N, Zylber-Haran E, Brooks B, Huerta M, Spitz IM. Serum anti-Müllerian hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation in women with polycystic ovaries with and without hyperandrogenism. *Hum Reprod* 2005;20:1814–1819.

Elgindy, EA, El-Haieg, DO, El-Sebaey, A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril* 2008, 89(6), 1670-1676.

Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:1796–802. [PubMed: 17327387]

Fanchin R, Mendez Lozano DH, Louafi N, Achour-Frydman N, Frydman R, Taieb J. Dynamics of serum anti-Müllerian hormone levels during the luteal phase of controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2005;20:747–751.

Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2003;18:328–32.

Fanchin, et al.; Per-follicle measurements indicate anti-müllerian hormone secretion is

modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertil Steril* 2005;84:167-73.

Fanchin, R., Schonäuer, L.M. Righini, C., Frydman, N., Frydman, R., Taieb, J.,. Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum. Reprod.* 2003^a; 18, 328-332.

Fanchin, R., Schonäuer, L.M. Righini, C., Frydman, N., Frydman, R., Taieb, J.,. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum. Reprod.* 2003b;18, 323-327.

Faure E, Gouédard L, Imbeaud S, Cate R, Picard JY, Josso N et al. Mutant isoforms of the anti-Müllerian hormone type II receptor are not expressed at the cell membrane. *J Biol Chem* 1996;271:30571-5.

Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. *Hum Reprod.* 2011 Jul;26(7):1616-24. doi: 10.1093/humrep/der092. Epub 2011 Apr 19.

Ficicioglu C, et al.; Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril*;2006;85:592-96.

Fleming, R., Deshpande, N., Traynor, I., Yates, R.W.,. Dynamics of FSH-induced follicular growth in subfertile women: relationship with age, insulin resistance, oocyte yield and anti-Müllerian hormone. *Hum. Reprod.* 2006; 21, 1436-1441.

García-Velasco JA, Motta L, Rodríguez S, Toribio M, Martínez-Salazar J, Pacheco A. Decreased concentrations of AMH in follicular fluid of women with endometriosis: A hypothetical new marker of oocyte quality. *Journal of endometriosis* 2009;1(1):52-56.

Gelbart WM, Irish VF, St Johnston RD, Hoffmann FM, Blackman RK, Segal D et al. The decapentaplegic gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1985;50:119-25.

Gelbart WM. The decapentaplegic gene. A TGF-beta homologue controlling pattern formation in *Drosophila*. *Development* 1989;107:65- 74.

Gleicher N, Weghofer A and Barad DH. AntiMullerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 2010; 94: 2824-2827.

Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 2008;23:1359–1365.

Gouédard L, Chen YG, Thevenet L, Racine C, Borie S, Lamarre I et al. Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor. *J Biol Chem* 2000;275:27973-8.

Gray AM, Mason AJ. Requirement for activin A and transforming growth factor-beta1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 1990;247:1328-30.

Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP (2003) Anti-Mullerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*, 2003; 211,85–90.

Ha TU, Segev DL, Barbie D, et al; Mullerian inhibiting substance inhibits ovarian cell growth through an Rb-independent mechanism. *J Biol Chem* 2000; Vol.275, 37101–37109.

Haqq C, Lee MM, Tizard R, Wysk M, DeMarinis J, Donahoe PK et al. Isolation of the rat gene for Müllerian inhibiting substance. *Genomics* 1992;12: 665-9.

Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 2004;82: 1323–1329.

Hehenkamp WJK, Loomans C, et al; Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Endocrinol Metab* 2006;91: 4057-63.

Hendershot GE, Pratt WF. Infertility and age: An unresolved issue. *Fam Plan Perspect* 1982; 14: 287-289.

Hendriks DJ. The role of poor response in the prediction of cumulative ongoing pregnancy rate in in vitro fertilization. Dynamic and basal ovarian reserve tests for

outcome prediction in IVF: comparisons and meta-analysis. Utrecht: 2005.

Hudson PL, Douglas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB et al. An immunoassay to detect human Müllerian inhibiting substance in males and females during normal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70: 16-22.

Iliodromiti S, Kelsey TW, Wu O, Anderson RA and Nelson SM. The predictive accuracy of anti-Müllerian hormone for live birth after assisted conception: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Hum Reprod Update* 2014; 20: 560-70.

Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattéi MG, di Clemente N, Tizard R et al. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a spontaneous mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nat Genet* 1995;11:382-8.

Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattéi MG, di Clemente N, Tizard R et al. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a spontaneous mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nat Genet* 1995;11:382-8.

Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR. Requirement of BMPR-IA for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet* 2002;32:408-10.

Jee BC, Ku SY, Suh CS, Kim KC, Lee WD, Kim SH. Serum Anti-Müllerian Hormone and Inhibin B Levels at Ovulation Triggering Day Can Predict the Number of Immature Oocytes Retrieved in In Vitro Fertilization Cycles. *J Korean Med Sci* 2008; 23: 657-61.

Jonard S, et al.; The ovarian markers of the FSH insufficiency in functional hypothalamic amenorrhea. *Hum Reprod* 2005;20:101-7.

Josso N, Forest MG, Picard JY. Müllerian – inhibiting activity of calf fetal testes: relationship to testosterone and protein synthesis. *Biol Reprod* 1975;13:163-7.

Josso N, Legeai L, Forest MG, Chaussain JL, Brauner R. An enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:23-7.

Josso N. Anti-Müllerian hormone: new perspectives for a sexist molecule. *Endocr Rev* 1986;7:421-33.

Josso N. Interspecific carácter of the Müllerian-inhibiting substance: action of the

human fetal testis, ovary and adrenal on the fetal rat Müllerian duct in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;32:404-9.

Josso N. Permeability of membranes to Müllerian inhibiting substance synthesized by the human fetal testis in vitro: a clue to its biochemical nature. *J Clin Endocrinol Metab* 1972;34:265-72.

Jost A. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 1953;8:379-418.

Jost A. Recherches sur la differentiation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1947;36:271-315.

Kanehisa MI. Use of statistical criteria for screening potential homologies in nucleic acid sequences. *Nucleic Acids Res* 1984;12:203-13.

Kaufman RJ, Wasley LC, Spiliotes AJ, Gossels SD, Latt SA, Larsen GR et al. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese Hamster ovary cell. *Mol Cell Biol* 1985;5:1750-9.

Kedem-Dickman A, Maman E, Yung Y, Yerushalmi GM, Hemi R, Hanochi M, et al. Anti-Müllerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes. *Reprod Biomed Online* 2012;24:540–6.

Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WH. A validated model of serum anti-müllerian hormone from conception to menopause. *PLoS One*. 2011;6(7):e22024. doi: 10.1371/journal.pone.0022024. Epub 2011 Jul 15.

Kevenaar ME, Meerasahib MF; Serum anti-müllerian hormone levels reflects the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 2006; 147:3228-3234.

Khader A1, Lloyd SM, McConnachie A, Fleming R, Grisendi V, La Marca A, Nelson SM. External validation of anti-Müllerian hormone based prediction of live birth in assisted conception. *J Ovarian Res*. 2013 Jan 7;6(1):3.

Koshy AK, Gudi A, Shah A, Bhide P, Timms P and Homburg R. Pregnancy prognosis in women with anti-Müllerian hormone below the tenth percentile. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29:662-665.

Kumbak B, Ulug U, Erzik B, Akbas H, Bahceci M. Early clinical pregnancy loss rate in poor responder patients does not change compared to age-matched normoresponders. *Fertil Steril*. 2009 Jan;91(1):106-9.

La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A. Anti- Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*. 2010; 16(2):113-30.

La Marca A, Giulini, R, et al; Anti-Müllerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum. Reprod* 2005b;20:1569-72.

La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P, Volpe A. Anti-Mullerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 2004;19:2738–2741.

La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, Manno M, Baraldi E, Roli L, Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, D'Amico R, Volpe A. Anti-Müllerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2011 Apr;22(4):341-9.

La Marca A, Papaleo E, D'Ippolito G, Grisendi V, Argento C, Volpe A. The ovarian follicular pool and reproductive outcome in women. *Gynecol Endocrinol*. 2012 Mar;28(3):166-9.

La Marca, A., De Leo, V., Giulini, S., Orvieto, R., Malmusi, S., Giannella, L., Volpe, A. Anti-Mullerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J.Soc.Gynecol.Investig* 2005a. 12, 545-548.

La Marca, A., Pati, M., Orvieto, R., Stabile, G., Carducci Artenisio, A., Volpe, A. Serum anti-Mullerian hormone levels in women with secondary amenorrhea. *Fertil. Steril*. 2006^a:85, 1547-1549.

La Marca, A., Stabile, G., Artenisio, A.C., Volpe, A. Serum anti-mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum. Reprod* 2006b: 21, 3103-3107.

La Marca, A., Volpe, A. The Anti-müllerian hormone and ovarian cancer. *Hum Reprod. Update* 2007;13, 265-273.

Larsen EC, Muller J, et al; Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and FSH<10IU. *Hum Reprod*, 2003;

Vol.18:417-422.

Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:318–23.

Lee JR, HyunKim S, SunMieKim, Jee BC, Seung-YupKu, SukSuh C, MinChoi Y, JungGuKim, YongMoon S. Anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation and optimal timing of measurement for outcome prediction. *Hum Reprod* 2010;25:2597-2604.

Lee JR, Kim SH, Kim SM, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Moon SY. Anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation and optimal timing of measurement for outcome prediction. *Hum Reprod*. 2010 Oct;25(10):2597-604.

Lee SJ. Identification of a novel member (GDF-1) of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol* 1990;4:1034-40.

Lehmann P, Velez MP, Saumet J, Lapensee L, Jamal W, Bissonnette F, Phillips S and Kadoch IJ. Anti-Müllerian hormone (AMH): a reliable biomarker of oocyte quality in IVF. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31: 493-498.

Li Y, Wei LN, Liang XY. Follicle-stimulating hormone suppressed excessive production of antimüllerian hormone caused by abnormally enhanced promoter activity in polycystic ovary syndrome granulosa cells. *Fertil Steril* 2011;95:2354–8.

Liberty G, Ben-Chetrit A, Margalioth EJ, Hyman JH, Galoyan N, Eldar-Geva T. Does estrogen directly modulate anti-Müllerian hormone secretion in women?. *Fertil Steril* 2010;94:2253–6.

Lie Fong S, Baart EB, Martini E, Schipper I, Visser JA, Themmen AP, de Jong FH, Fauser BJ and Laven JS. Anti-Müllerian hormone: a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality? *Reprod Biomed Online* 2008; 16:664-670.

Lie Fong, S., Lugtenburg, P.J., Schipper, I., Themmen, A.P., de Jong, F.H., Sonneveld, P., Laven, J.S., 2008. Anti-müllerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. *Hum. Reprod.* 23, 647-678.

Lin PY, Huang FJ, Kung FT, Chiang HJ, Lin YJ, Lan KC. Evaluation of serum anti-

mullerian hormone as a biomarker of early ovarian aging in young women undergoing IVF/ICSI cycle. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(9):6245-6253.

Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M et al. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 1986;321:779-82.

Liu MA, Oliff A. Transforming Growth factor-beta- Müllerian inhibiting substance family of growth regulators. *Cancer Invest* 1991;9:325-36.

Lorenzo HK, Teixeira J, Pahlavan N, Laurich VM, Donahoe PK, MacLaughlin DT. New approaches for high-yield purification of Müllerian inhibiting substance improve its bioactivity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;766:89-98.

Lutchman Singh, K., Muttukrishna, S., Stein, R.C., McGarrigle, H.H., Patel, A., Parikh, B., Groome, N.P. Davies, M.C. Chatterjee, R., 2007. Predictors of ovarian reserve in Young women with breast cancer. *BR.J. Cancer* 96, 1808-1816.

Lyons K, Graycar JL, Lee A, Hashmi S, Lindquist PB, Chen EY et al. Vgr-1, a mammalian gene related to *Xenopus* Vg-1, is a member of the transforming growth factor beta gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4554-4558.

MacLaughlin DT, Epstein J, Donahoe PK. Bioassay, purification, cloning, and expression of Müllerian inhibiting substance. *Methods Enzymol* 1991;198:358-69.

Majumder K, Gelbaya TA, Laing I and Nardo LG. The use of anti-Müllerian hormone and antral follicle count to predict the potential of oocytes and embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 150: 166-170.

Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying SY et al. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor beta. *Nature* 1985;318:659-63.

Massagué J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling. *Gene Dev* 2000;14:627-44.

Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-78.

Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.

Méduri G, Massin N, et al; Serum anti-Müllerian hormone expression in woman

Mehta BM, Chimote MN, Chimote NN, Nath NM, and Chimote MN. Follicular-fluid anti-Müllerian hormone (FF AMH) is a plausible biochemical indicator of functional viability of oocyte in conventional in vitro fertilization (IVF) cycles. *J Hum Reprod Sci.* 2013 Apr-Jun; 6(2): 99–105.

Mei- Juo Chen, et al; The relationship between anti-Müllerian hormone, androgen and insulin resistance on the number of antral follicles I women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2008;23:952-57.

Menken J, Trussell J, Larsen U. Age and infertility. *Science* 1986; 233:1389-1394.

Messinis IE, Templeton AA. Relationship between intrafollicular levels of prolactin and sex steroids and in-vitro fertilization of human oocytes. *Hum Reprod.* 1987;2:607–9.

Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL et al. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway. *Genes Dev* 1996;10:2577-87.

Munstenberg A, Novell-Badge R. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 1991;113:613-24.

Münsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti- Müllerian gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 1991;113:613-24.

Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004;111:1248–1253.

Nachtigal MW, Ingraham HA. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/ subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7711-6.

Nakhuda GS, Chu MC, Wang JG, Sauer MV, Lobo RA. Elevated serum mullerian-inhibiting substance may be a marker for ovarian hyperstimulation syndrome in normal women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;85:1541–1543.

Navot D, Bergh PA y Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevetion and treatment. *Fertil Steril* 1992;58:249-61.

Nelson SM et al. Biomarkers of ovarian response: current and future applications. *Fertil Steril*. 2013 Mar 15;99(4):963-9.

Nelson SM, La Marca A 2011. The journey from he old to the new AMH assay: how to avoid getting lost in the values. *Reprod. BioMed. Online* 23, 411-420.

Nelson SM, Yates RW and Fleming R. Serum anti-Mullerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles--implications for individualization of therapy. *Hum Reprod* 2007; 22: 2414-2421.

Nelson, S.M., Yates, R.W., Lyall, H., Jamieson, M., Traynor, I., Gaudoin, M., Mitchell, P., ambrose, P., Fleming, R., 2009. Anti-Mullerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum. Reprod.* 24, 867-875.

Nielsen ME, Rasmussen IA, Kristensen SG, et al. In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA. *Mol Hum Reprod* 2011;17:63–70.

Nikolaou D1, Templeton A. Early ovarian ageing: a hypothesis. Detection and clinical relevance. *Hum Reprod.* 2003 Jun;18(6):1137-9.

Ocal P, Aydin S, Cepni I, Idil S, Idil M, Uzun H, et al. Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, Inhibin A and Inhibin B in IVF cycles: Are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;115:194–9.

Oriol B, Barrio A, Pacheco A, Serna J, Zuzuarregui JL, Garcia-Velasco JA. Systemic methotrexate to treat ectopic pregnancy does not affect ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2008 Nov;90(5):1579-82. Epub 2007 Dec 11.

Overbeek A, Broekmans FJ, Hehenkamp WJ, et al. Intra-cycle fluctuations of anti-Mullerian hormone in normal women with a regular cycle: a re-analysis.*Reprod Biomed Online* 2012;24:664–9.

Padgett RW, St Johnston RD, Gelbart WM et al. A transcript from a *Drosophila* pattern

gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* 1987;325:81-4.

Parr BA, McMahon AP. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* 1998;395:707-10.

Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J. Basal and stimulation day 5 anti-Müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist—gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 2005;20:915–922.

Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK et al. Proteolytic processing of Müllerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment. *J Biol Chem* 1988;263:18981-18986.

Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A.. Cloning and expression of cDNA for anti-Müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5464-8.

Picard JY, Goulut C, Bourrillon R, Josso N. Biochemical analysis of bovine testicular anti-Müllerian hormone. *FEBS Lett* 1986;195:73-76.

Picard JY, Josso N.. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol* 1984;34:23-9.

Picard JY, Tran D, Josso N.. Biosynthesis of labelled anti-Müllerian hormone by fetal testes: evidence for the glycoprotein nature of the hormone and for its disulfide-bonded structure. *Mol Cell Endocrinol* 1978;12:17-30.

Picon R. Action du testicule foetal sur le développement in Vitro des canaux de Müller chez le rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1969;58:1-19.

Picon R. Modifications, chez le rat, au cours du développement du testicule. De son action inhibitrice sur le canaux de Müller in vitro. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1970;271:2370-2.

Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D.

Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Dec;88(12):5957-62.

Piltonen T, et al.; Serum anti-Müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2005;20:1820-1826.

Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferré A, Huhtaniemi I et al. Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Acad Sci U S A* 1998;95:594-9.

Ragin RC, Donahoe PK, Kenneally MK, Ahmad MF, MacLaughlin DT. Human Müllerian inhibiting substance: enhanced purification imparts biochemical stability and restores antiproliferative effects. *Protein Expression Purif* 1992;3:236-45.

Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3836-44.

Reichman DE, Goldschlag D and Rosenwaks Z. Value of antimüllerian hormone as a prognostic indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2014; 101: 1012-1018, e1.

Riggs R, Kimble T, Oehninger S, Bocca S, Zhao Y, Leader B and Stadtmauer L. Anti-Müllerian hormone serum levels predict response to controlled ovarian hyperstimulation but not embryo quality or pregnancy outcome in oocyte donation. *Fertil Steril* 2011; 95: 410-412.

Robertson DM, Hale GE, Fraser IS, Hughes CL, Burger HG. Changes in serum antimüllerian hormone levels across the ovulatory menstrual cycle in late reproductive age. *Menopause* 2011;18:521–4.

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004 Jan;81(1):19-25.

Sánchez I, Amorós D, Lucco F, González S, Ballesteros A, Pellicer A. Inseminación artificial.

Práctica de esterilidad y reproducción humana. 3a edición. Ed. McGraw-Hill. 2007: 123-138.

Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril* 1999;72:845-51.

Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Sheldon RM. Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002;77:468–471.

Shin SY, Lee JR, Noh GW, Kim HJ, Kang WJ, Kim SH, Chung JK. Analysis of serum levels of anti-Mullerian hormone, inhibin B, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, and follicle-stimulating hormone with respect to age and menopausal status. *J Korean Med Sci* 2008;23:104–110.

Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL, Blazar AS. Mullerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod* 2006;21:159–163.

Son WY, Das M, Shalom-Paz E, Holzer H. Mechanisms of follicle selection and development. *Minerva Ginecol* 2011;63:89–102.

Stephen EH, Chandra A. Updated projections of infertility in the United States: 1995-2025. *Fertil Steril* 1998; 70: 30-34.

Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008;89:583-591.

Takahashi M, Hayashi M, Mangano TF, Donahoe PK. The oncogenicity of Müllerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod* 1986;35:447-53.

Tal R, Seifer DB, Khashimov M, Malter HE, Grazi RV, Leader B. Characterization of

women with elevated antimüllerian hormone levels (AMH): correlation of AMH with polycystic ovarian syndrome phenotypes and assisted reproductive technology outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2014;210, in press.

Tatone, C; Amicarelli, F; Carbone MC; et al; Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Rep Update*; 2008. Vol.14. No. 2: 131-142.

Te Velde ER y Pearson PL. The variability of female reproductive aging. *Hum Reprod Update* 2002;8:141-154.

Tran D, Picard JY, Campargue J, Josso N. Immunocytochemical detection of anti-Müllerian hormone in Sertoli cells of various mammalian species, including man. *J Histochem Cytochem* 1987;35:733-43.

Tsung. et al.; Serum anti-müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod* 2008;23:160-67.

Ueno S, Kuroda T, Maclaughlin DT, Ragin RC, Manganaro TF, Donahoe PK et al. Müllerian inhibiting substance in the adult rat during various stages of the estrous cycle. *Endocrinology* 1989;125:1060-6.

Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999;397:405-9.

Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W et al. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 1986;321:776-8.

van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP, de Jong FH, Peeters PH, van der Schouw YT, Broekmans FJ. Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2129–2134.

Van Disseldorp, J., Lambalk, C.B. Kwee, J., Looman, C.W., Eijkemans, M.J., Fauser, B.C., and Broekmans, F.J. 2009. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Müllerian hormone and antral follicle counts. *Hum. Reprod.*

Van Rooij IAJ, Broekmans FJM, Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, Jong FH. Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17:3065–71.

Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, et al. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 495-500.

Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti- Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 1984;114:1315-20.

Vigier B, Tran D, du Mesnil du Buisson F, Heyman Y, Josso N. Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti- Müllerian hormone. *L Reprod Fertil* 1983;69:207-14.

Visser JA, McLuskey A, Verhoef-Post M, Kramer P, Grootegoed JA, Themmen AP. Effect of prenatal exposure to diethylstilbestrol on Müllerian duct development in fetal male mice. *Endocrinology* 1998;139:4244-51.

Visser JA, Olaso R, Verhoef-Post M, Kramer P, Themmen AP, Ingraham HA. The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Mullerian inhibiting substance signaling. *Mol Endocrinol* 2001;15:936-45.

Visser, J.A., Themmen, A.P. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol* 2005; 234, 81-86.

Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, Sporn MB. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* 1988;263:7646-54.

Wallen JW, Cate RL, Kiefer DM, Riemen MW, Martinez D, Hoffman RM et al. A Minimal anti-proliferative effect of recombinant Müllerian inhibiting substance on gynaecological tumor cell lines and tumor explants. *Cancer Res* 1989;49:2005-2011.

Weeks DL, Melton DA. A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell* 1987;51:861-7.

Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77-83.

Weenen, C., Laven, J.S.E., von Bergh, A. R.M., Cranfield, M., Groome, N.P., Visser, J.A., Kramer, P., Fauser, B.C.J.M., Themmen, A.P.N., 2004. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 77-83.

Weintraub A, Margalioth EJ, Chetrit AB, Gal M, Goldberg D, Alerhand S, Eldar-Geva T. The dynamics of serum anti-Mullerian-hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH-antagonist short protocol in polycystic ovary syndrome and low responders. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2014;176,63–167.

Wen X, Tozer AJ, Butler SA, Bell CM, Docherty SM, Iles RK. Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize. *Fertil Steril.* 2006;85:1723–9.

Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B et al. Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, anovel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol* 1993;7:245-57.

World health organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing oh human semen. Fifth edition. 2010.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-34.

Wunder DM, Guibourdenche J, Birkhäuser MH, Bersinger NA. Anti-Müllerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2008;90:2203–10.

9.- ANEXOS

Anexo 1.- Los datos preliminares de este trabajo fueron presentados en ponencia en el 29º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, celebrado en Granada en mayo de 2012.



Anexo 2.- Los datos preliminares de este trabajo fueron presentados en el Congreso Internacional "Ovarian Club", celebrado en Praga en Noviembre de 2012.

ANTI-MÜLLERIAN HORMONE DYNAMICS DURING CONTROLLED OVARIAN HYPERSTIMULATION.

L. Melado Vidales¹, V. González Villafañez¹, V. Verdú Merino¹, J.M. Bajo Arenas¹, I. Bruna Catalán².

¹Clínica Ginefiv. ² Hospital universitario Montepríncipe, Madrid, Spain.

INTRODUCTION

Anti-Müllerian hormone (AMH) is good marker of ovarian reserve and predictor of ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation (COH). The aim of this study is to investigate changes in AMH levels during the COH cycle.

METHODS

Our study included 20 women who underwent in vitro fertilization (IVF) cycles with antagonist protocol. The patients were divided into low (n=8, AMH= 0-1,5 ng/ml), normal (n=6, AMH= >1,5-3,5 ng/ml), high responders (n=6, AMH= >3,5 ng/ml). Serum AMH were measured at baseline, day of antagonist administration, day of hCG administration (dhCG), and follicular fluid (FF) from dominant follicles upon oocyte retrieval. AMH were analyzed for changes during the cycle and for correlations with COH outcome parameters.

RESULTS

Serum AMH levels decreased progressively during COH and showed its minimum level on dhCG in each patient group (figure 1 and 2).

Serum AMH levels on every sample day were significantly correlated with this COH outcomes: dose of gonadotrophins used, estradiol level on dhCG, number of oocytes retrieved (Table 1).

The correlation with fertilized oocytes and top quality embryos was not statistically significant.

	Baseline		D Antagonist		dhCG		FF	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Dose of gonadot used.	-0,814	p<0,001	-0,869	p<0,001	-0,882	p<0,001	-0,723	p<0,001
Serum E2 on dhCG.	0,73	p<0,001	0,667	p<0,001	0,725	p<0,001	0,366	p<0,001
Nº oocytes retrieved.	0,797	p<0,001	0,799	p<0,001	0,838	p<0,001	0,563	p<0,01
Nº fertilized oocytes.	0,312	p=0,08	0,267	p=0,12	0,252	p=0,15	0,28	p=0,13
Top Quality embryos.	0,061	p=0,39	0,101	p=0,33	0,113	p=0,32	0,04	p=0,43

Table 1. Correlations of serum and FF AMH concentrations with COH outcomes.

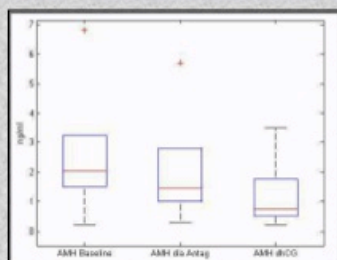


Figure 1: Serum levels of AMH in the baseline day, day of antagonist administration and dhCG in the total group of patients.

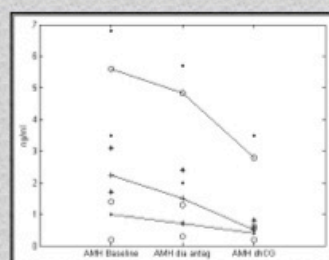


Figure 2: declining AMH levels during COH in each patient group: low, normal and high responders.

CONCLUSIONS

Serum AMH levels during COH are good markers to predict ovarian response, and the baseline serum level seems to be an efficient predictive marker. Besides this predictive ability, larger series are required to demonstrate that AMH levels during COH could be a valuable predictor of oocyte and embryo quality.

el estudio.

Estudio de los niveles intracíclicos de Hormona Antimülleriana en suero y en líquido folicular como marcador de reserva ovárica, respuesta folicular.

HOJA INFORMATIVA SOBRE EL ESTUDIO.

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Dra. Laura Melado Vidales.

PROMOTORES DEL ESTUDIO: Dr. Bajo Arenas, Dr. Bruna.

Usted va a formar parte de un estudio clínico con el que se pretende mejorar la efectividad de la técnica de Fecundación In Vitro y mejorar las tasas de éxito de la misma. El estudio consiste en tres determinaciones de la **Hormona anti-Mülleriana** en su muestra de sangre obtenida por punción venosa y en el líquido folicular, una vez se hayan obtenido y retirado los ovocitos presentes.

La duración prevista de este ensayo es de 3 años y se realizará sobre alrededor de 60 pacientes de nuestra consulta que se vayan a realizar un ciclo de FIV/ICSI.

Las visitas a la consulta de Esterilidad no variarán a pesar de su inclusión en este estudio y no precisará ningún procedimiento extraordinario a los habitualmente empleados en la realización de cualquier FIV/ICSI. No precisará la toma de ningún fármaco experimental y no presentará efectos adversos o complicaciones diferentes a los de cualquier ciclo de FIV/ICSI rutinario.

Con este estudio se espera poder emplear esta hormona como marcador pronóstico del ciclo de FIV/ICSI, para poder planificar así una estrategia de tratamiento adecuada a cada paciente, mejorando con ello las tasas de éxito de la técnica.

La inclusión en este estudio es voluntaria y la no participación en el mismo no comportará ningún perjuicio ni para su salud ni para el éxito del tratamiento de fecundación. Usted podrá abandonar el estudio en cualquier momento sin que ese hecho disminuya la calidad asistencial hacia su persona. Los investigadores encargados se comprometen a dar información sobre datos relevantes derivados del estudio que puedan influir en su decisión de continuar participando en el mismo.

Los datos extraídos serán tratados de forma confidencial según lo establecido en la ley LOPD 15/1999. Estos datos, así como los resultados derivados del estudio podrán ser

publicados en revistas científicas de ámbito nacional e internacional, así como ser comunicados en congresos científicos, siempre garantizando la confidencialidad de los datos.■

CONSENTIMIENTO FIRMADO ESCRITO

Yo, (Nombre y Apellidos) He leído la hoja de información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el estudio. He recibido suficiente información sobre el estudio.

Comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

FIRMA DE LA PARTICIPANTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

Fecha:

